

Enzymatische Baeyer-Villiger-Oxidationen durch flavinabhängige Monooxygenasen

Von Christopher T. Walsh* und Y.-C. Jack Chen

Seit einiger Zeit findet die Biochemie der Mikroorganismen wieder verstärktes Interesse. Dies beruht nicht zuletzt auf der Tatsache, daß ständig mehr unnatürliche organische Substanzen in die Biosphäre gelangen und deshalb Mikroorganismen zum Abbau dieser Xenobiotica gesucht werden. Weiterhin haben Fortschritte auf dem Gebiet der Gentechnologie neue Möglichkeiten eröffnet, die „chemische Fabrik“ der Bakterien zu nutzen. Durch die Baeyer-Villiger-Reaktion können relativ einfach Ketone in Ester oder Lactone umgewandelt werden; die Reaktion ist für die organische Synthese äußerst nützlich. Jedoch läßt die Ausbeute zu wünschen übrig, und hin und wieder sind drastische Reaktionsbedingungen nötig. Es gibt nun Bakterien, die in Medien mit aliphatischen Verbindungen leben können und Enzyme besitzen, die Baeyer-Villiger-Reaktionen katalysieren. Diese Enzyme, sogenannte Monooxygenasen, sind am Abbau acyclischer und alicyclischer Ketone zu einfacheren Verbindungen beteiligt. Bemerkenswert ist die Vielzahl von Reaktionen, die von einigen dieser Enzyme katalysiert wird. Aufgrund dieser Mannigfaltigkeit und der Zugänglichkeit von reinen Enzymen mit Hilfe der Gentechnologie erhöhen sich die Chancen, diese Biokatalysatoren als Reagentien für die organische Synthese nutzen zu können.

1. Einleitung

Die Oxidation von Ketonen zu Estern oder Lactonen durch die Baeyer-Villiger-Reaktion ist eine zuverlässige und ausgesprochen nützliche Reaktion in der organischen Synthese^[1-3]. Im allgemeinen verwendet man für die Baeyer-Villiger-Reaktion Persäuren, da die Reaktion mit einfachen Peroxiden, wenn überhaupt, nur mit geringen Ausbeuten abläuft. Die sich leicht bildenden, oft isolierbaren tetraedrischen Peroxy-Addukte aus Ketonen und H_2O_2 ^[4] oder Alkylhydroperoxiden neigen nur wenig zu der für die Entstehung der Ester oder Lactone notwendigen Alkylgruppenwanderung^[5-11]. Durch Persäuren können die tetraedrischen Addukte leicht zu den entsprechenden Carbonsäuren oxidiert werden. Einige Reaktionsgeschwindigkeiten sind in Tabelle 1 aufgeführt. Dies möge als Hin-

tergrundinformation zur chemischen Baeyer-Villiger-Oxidation genügen. Im folgenden soll der aktuelle Wissensstand der biologischen Baeyer-Villiger-Oxidation – Enzyme, Cofaktoren und Substrate – präsentiert werden.

In Tabelle 2 sind sieben Reaktionen aufgeführt, bei denen es sich um enzymkatalysierte Baeyer-Villiger-Oxidationen handelt, wofür Stöchiometrie und in einigen Fällen die Ergebnisse detaillierter mechanistischer Untersuchungen sprechen. Die ersten fünf Transformationen (a)–(e), Campher zu Campholid^[12], 2-Tridecanon zum entsprechenden Acetat^[13], Progesteron zu Testosteronacetat^[14], Cyclohexanon zu ϵ -Caprolacton^[15] bzw. Tetradeanal zum entsprechenden Carboxylat^[16], werden alle durch bakterielle Enzyme katalysiert, die bis zur Homogenität gereinigt und als einheitliche Biokatalysatoren charakterisiert wurden. Wie im folgenden Abschnitt näher beschrieben, benötigen alle fünf Enzyme molekularen Sauerstoff als Cosubstrat; sie enthalten oder verwenden Riboflavinderivate als Cofaktoren und enthalten keine Übergangsmetalle. Reaktion (e) wird durch Leuchtbakterien katalysiert, wobei als „Nebenprodukt“ der Oxidation des Aldehyds zur Carbonsäure Photonen – blaugrünes Licht – entstehen^[16]. Viele Leuchtfische beherbergen diese Photobakterien in ihren Leuchtdioden.

Die letzten beiden Transformationen (f) und (g) sind Teil des Metabolismus der hepatotoxischen, carcinogenen Aflatoxin-Schimmelpilze. Bei der Umwandlung von Aflatoxin B zu Aflatoxin G₁ findet eine oxidative Ringerweiterung des anellierten Cyclopentanons zu einem Sechsringlacton statt. Die zweite Transformation spielt, so wird vermutet^[17], in einem früheren Stadium der Aflatoxin-Biosynthese eine Rolle. Bei beiden Reaktionen sind bisher keine weiteren biochemischen Informationen vorhanden. Es gibt darüber hinaus Dutzende weiterer Beispiele von Naturstoffen und biogenetischen Reaktionswegen im Pflanzenmetabolismus, bei denen Baeyer-Villiger-Reaktionen postuliert oder wahrscheinlich gemacht wurden.

Tabelle 1. Reaktionsgeschwindigkeiten der Baeyer-Villiger-Oxidation von drei Substraten mit verschiedenen Reagentien.

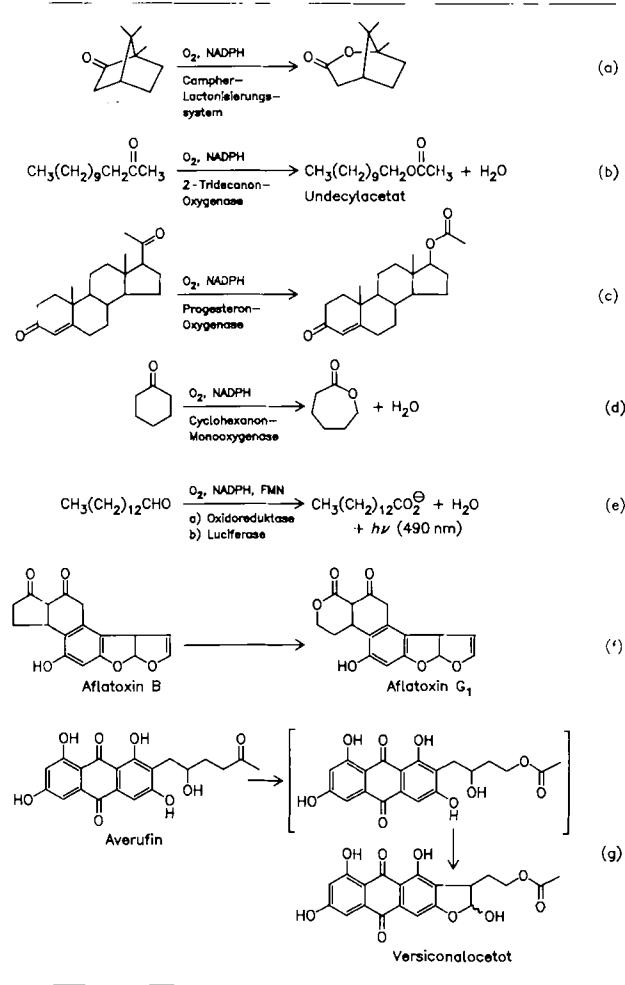
Reagens	Cyclohexanon	Cyclohexylmethylketon	Acetophenon
$tBuOOH$	langsam	langsam	langsam
H_2O_2	langsam	langsam	langsam
$C_6H_5CO_2H$	$96-158 \times 10^{-5}$ $M^{-1} s^{-1}$	$11.7-14.1 \times 10^{-5}$ $M^{-1} s^{-1}$	1.5×10^{-5} $M^{-1} s^{-1}$
	($CHCl_3$, 25 °C)	($CHCl_3$, 15 °C)	($CHCl_3$, 28 °C)
CF_3CO_2H	6.1×10^{-2} $M^{-1} s^{-1}$	5.7×10^{-3} $M^{-1} s^{-1}$	1.7×10^{-3} $M^{-1} s^{-1}$

[a] Für Isopropylmethylketon.

[*] Prof. Dr. C. T. Walsh [†], Dr. Y.-C. J. Chen
Department of Chemistry and Biology
Massachusetts Institute of Technology
Cambridge, MA 02139 (USA)

[†] Neue Adresse:
Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology
Harvard Medical School
Boston, MA 02115 (USA)

Tabelle 2. Biologische Baeyer-Villiger-Oxidationen.



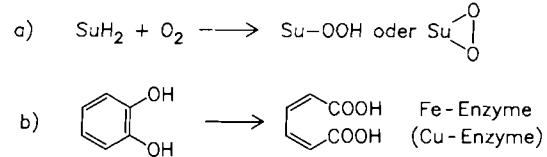
Angesichts der Beobachtung, daß bei den fünf bisher isolierten Enzymen der Baeyer-Villiger-Reaktion molekularer Sauerstoff als Cosubstrat und Flavine als Cofaktoren auftreten, wollen wir im nächsten Abschnitt unsere Aufmerksamkeit den Oxygenasen und deren Cofaktoren zuwenden.

2. Klassifizierung der Oxygenasen

Enzyme, die reduktiv Sauerstoff (O_2) aktivieren und ihn in Substrate einbauen, werden in Mono- und Dioxygenasen eingeteilt, je nachdem, ob ein oder zwei Atome des molekularen Sauerstoffs auf dem Weg zu den Reaktionsprodukten in das Substrat „Su“ eingeführt werden^[18] (Abb. 1). Dioxygenasen enthalten normalerweise fest gebundenes Eisen, sei es in einem Häm-Komplex oder in anderer Umgebung. Beispiele sind die Enzyme für 1,4-Dioxygenierungen in der Prostaglandin- und Leukotrien-Biosynthese, für die Funktionalisierung aromatischer Ringsysteme durch Mikroorganismen, z. B. die Umwandlung von Benzol zum *cis*-1,2-Dihydroxy-Derivat, und für die oxidative Spaltung von Phenolen und Brenzcatechinen beim biologischen Abbau aromatischer Ringsysteme. Monooxygenasen, zu denen als Unterklasse die „Baeyer-Villiger-Enzyme“ zählen, weisen dagegen eine größere Vielfalt an Cofaktoren auf und zeichnen sich dadurch aus, daß aus einem der beiden Sauerstoffatome des O_2 stets H_2O gebildet

wird. Die Erzeugung der aktiven Sauerstoffübertragenden Spezies wird bei den Monooxygenasen durch Systeme bewerkstelligt, die zu Zweielektronenübertragungen fähig sind, wobei Übergangsmetalle (Fe, Cu) oder gebundene organische Cofaktoren (Pteridine oder Flavine) beteiligt sind. Die Bildung von Oxometallverbindungen oder anderen oxidierten Intermediaten wird durch die sukzessive Übertragung von zwei Elektronen auf O_2 möglich. Die allgemeine Stöchiometrie gibt Gleichung (1) in Abbildung 1 wieder.

Dioxygenasen



Monooxygenasen

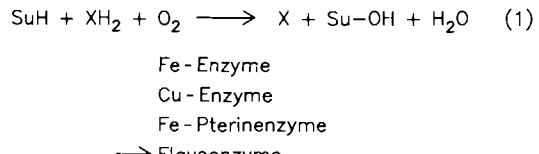
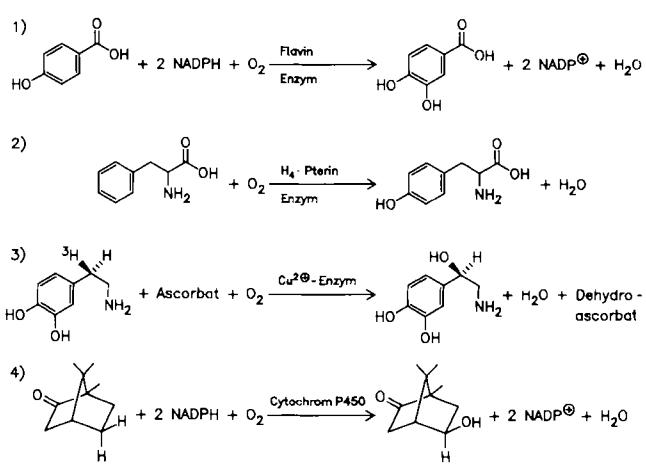


Abb. 1. Die beiden Klassen von Oxygenasen und ihre katalytische Reaktivität. Dioxygenasen benötigen Metalle als Cofaktoren, während bei den Monooxygenasen Metalle oder organische Cofaktoren beteiligt sind.

Man unterscheidet nach Cofaktoren vier Typen von Monooxygenasen (Tabelle 3). Eine typische flavinabhängige Monooxygenase repräsentiert die bakterielle *p*-Hydroxybenzoësäure-Hydroxylase, die die *ortho*-Hydroxylierung eines aktivierten Arylsystems zu Brenzcatechin-Derivaten katalysiert^[19]. Der zweite Typ von Monooxygenasen enthält einen fest gebundenen organischen Cofaktor. Als Beispiel sei das erste Enzym der Biosynthese des Neurotransmitters Adrenalin, die Phenylalanin-Hydroxylase, erwähnt, das eine komplizierte regiospezifische Funktionalisierung des nichtaktivierten Phenylalanins zum Tyrosin ermöglicht. Während im Falle der Flavoenzyme das Dihydro-Nicotinamid NADPH die Reduktionsäquivalente liefert, verwendet die Phenylalanin-Hydroxylase Tetrahydrobiopt-

Tabelle 3. Vier Typen von Monooxygenasen katalysieren die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser bei gleichzeitiger Oxidation eines Substrats. Die Klassifizierung erfolgt anhand der Cofaktoren.



rin, wobei zunächst das 4a-Hydroxy-pterin gebildet wird, welches schließlich enzymatisch zum chinoiden Dihydrobiopterin dehydratisiert. Für die Aktivität der Phenylalanin-Hydroxylase ist ferner Eisen im aktiven Zentrum notwendig; es ist nicht unwahrscheinlich, daß eine hochvalente Oxoeisenverbindung im aktiven Zentrum die eigentliche oxygenierende Spezies ist^[20]. Ein Beispiel für den dritten Typ von Monooxygenasen ist Dopamin-β-Hydroxylase; sie findet sich auf demselben Biosyntheseweg, ist jedoch ein kupferabhängiges Enzym. Es hydroxyliert Dopamin in benzylischer Position zu Noradrenalin^[21]. Das Reduktionsagens XH₂ ist Ascorbinsäure, das wohlbekannte Vitamin C.

Der vierte Typ schließlich sind eisenhaltige Enzyme. Unser Beispiel ist ein Häm-Protein aus der Familie der P₄₅₀-Cytochrome, welches Campher in die 5-exo-Hydroxyverbindung überführt; diese Reaktion steht am Beginn des Katabolismus dieses bicyclischen Substrats. Die Hydroxylierung der nichtaktivierten CH₂-Gruppe läuft regio- und stereoselektiv ab^[22].

Die Baeyer-Villiger-Enzyme sind flavinabhängige Monooxygenasen; die katalytischen Fähigkeiten dieser Vitamin-B₂-Enzyme werden im folgenden geschildert. In Abbildung 2 sind die coenzymatisch aktiven Formen von Riboflavin, das 5'-Phosphat FMN (Coenzym der Luciferase)

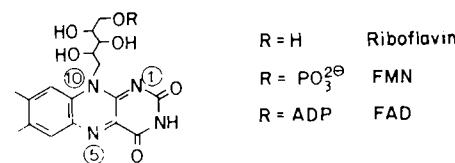


Abb. 2. Riboflavin (Vitamin B₂) und seine als Enzym-Cofaktoren aktiven Formen.

und der 5'-ADP-Ester FAD dargestellt. FAD ist das wichtigste Coenzym in flavinabhängigen Monooxygenasen; es ist meist fest (über mehrere Katalysezyklen) an das aktive Zentrum gebunden. Das tricyclische Isoalloxazin nimmt bei der Redoxkatalyse eine Schlüsselstellung ein. Die Rolle des exogenen Reduktionsagens NADPH ist lediglich die Umwandlung von gebundenem FAD in das 1,5-Dihydroregioisomer FADH₂.

FADH₂ (und FMNH₂) enthält einen zentralen Dihydropyrazinring, der leicht unter Abgabe von einem (Bildung eines Semichinons) oder zwei Elektronen reoxidiert werden kann; das System FADH₂/FAD spielt in der Biochemie als Ein- und Zweielektronenüberträger eine große Rolle^[23] (Abb. 3). Die kinetischen und thermodynamischen Ei-

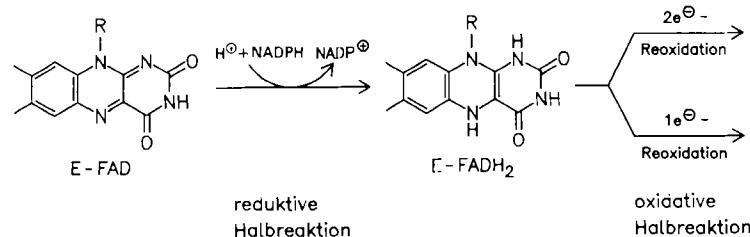


Abb. 3. Die Vielseitigkeit des Flavin-Cofaktors in der Redoxkatalyse beruht auf seiner Fähigkeit sowohl zum Ein- als auch zum Zweielektronentransfer. E = Enzym.

genschaften des Semichinon-Intermediates bilden die Grundlage für die schnelle Reaktion von FADH₂ mit O₂, bei der das Radikal anion O₂^{•-}, das „Hyperoxid-Ion“, und FADH⁺ entstehen. Die schnelle Rekombination der Radikale führt zu 4a-Hydroperoxyflavin, welches erstmals bei der bakteriellen Luciferase mit Hilfe cryoenzymologischer Untersuchungen als Zwischenstufe charakterisiert werden konnte^[23]. Das Hydroperoxyflavin kann nun entweder unter H₂O₂-Abspaltung wieder in das reoxidierte Flavin übergehen oder aber in einer intermolekularen Reaktion im aktiven Zentrum eines Flavoenzyms durch die Spaltung der O–O-Bindung ein Substrat monooxygenieren. Die dabei gleichfalls entstehende Pseudobase 4a-Hydroxyflavin reagiert unter intramolekularer Abspaltung von H₂O schließlich weiter zu FAD, das dann für einen weiteren Katalysezyklus zur Verfügung steht (Abb. 4).

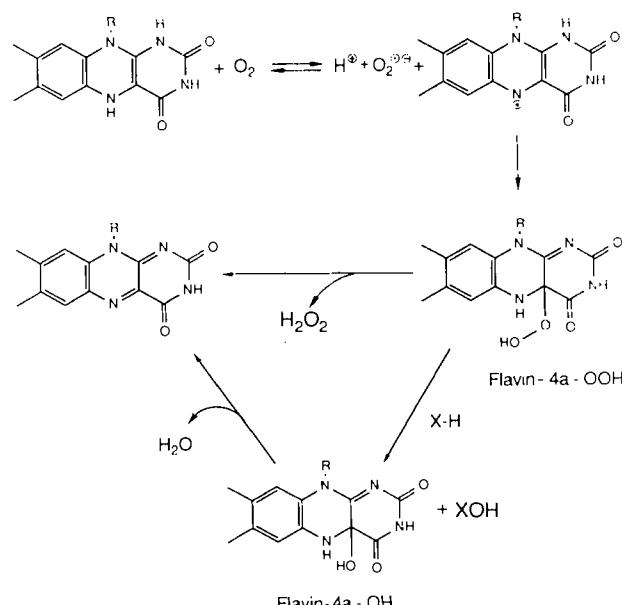
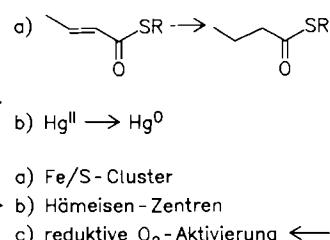


Abb. 4. Mögliche Reaktion des reduzierten Flavins mit Sauerstoff. Das Hydroperoxyflavin-Intermediat kann entweder direkt zu oxidiertem Flavin und H₂O₂ zerfallen oder unter Bildung des 4a-Hydroxyflavins ein Substrat XH oxygenieren; Wasserabspaltung führt auch dann zum oxidierten Flavin.

Die Substrate, die mit Flavoenzymen monooxygeniert werden können, lassen sich in drei Kategorien einteilen: a) Phenole (reagieren zu Brenzcatechinen), b) Heteroatom-Verbindungen (zu den entsprechenden Oxiden), c) Ketone (zu Estern oder Säuren). Die letzte Kategorie soll im folgenden diskutiert werden.



3. Flavinabhängige Monooxygenasen für Baeyer-Villiger-Oxidationen

Zwar wird im Zentrum dieses Beitrags Cyclohexanon-Monooxygenase, das mechanistisch am besten untersuchte Beispiel eines Baeyer-Villiger-Enzyms, stehen, doch sei vorher kurz auf einige andere Flavoenzyme aus Tabelle 2 eingegangen. Pseudomonaden vermögen auf Campher als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Ihre Strategie für die Umwandlung des Bicycloheptan-Gerüstes in metabolisch verwertbare Bausteine ist einzig die Monooxygenierung.

Wie in Abbildung 5 dargestellt, kann Campher zwar direkt durch einen enzymatischen Baeyer-Villiger-Prozeß oxygeniert werden; der wichtigere metabolische Weg läuft

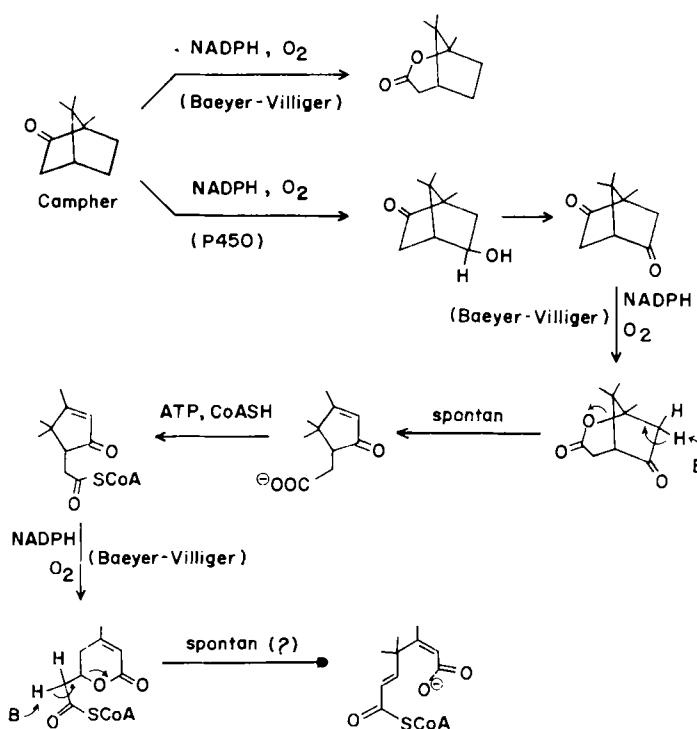


Abb. 5. Der oxidative Abbau von Campher. Die einleitende Hydroxylierung durch eine Cytochrome-P₄₅₀-Monooxygenase aktiviert das bicyclische System für die nachfolgenden Fragmentierungen der Ringe durch Baeyer-Villiger-Oxidationen.

jedoch zunächst über die Bildung des 5-exo-Alkohols durch die P₄₅₀-Campher-Hydroxylase (Zeile 4 in Tabelle 3), die anschließende Oxidation des Alkohols zum Diketon und schließlich über eine Baeyer-Villiger-Oxidation unter der erwarteten Einführung eines Sauerstoffatoms zwischen Carbonyl-C-Atom und Brückenkopf-C-Atom^[12, 24, 25]. Das resultierende Lacton ist in schwach basischem Milieu instabil; es zerfällt zu einem monocyclischen Cyclopentenon mit einer Carboxymethyl-Gruppe. Die Säurefunktion wird in den Coenzym-A-Thioester überführt und der letzte Ring schließlich mit einem weiteren Baeyer-Villiger-Enzym zu acyclischen Metaboliten geöffnet. Hier ist die Schlüsselrolle verschiedener Baeyer-Villiger-Enzyme für den Abbau von Kohlenstoffgerüsten gut zu erkennen.

Die 2-Tridecanon-Oxygenase von *Pseudomonas cepacia* erwies sich als höchst unselektives Enzym zur Insertion

von Sauerstoff (Abb. 6). Sie wandelt C₇- bis C₁₄-Methylketone in die entsprechenden Alkylacetate um. Darüber hinaus akzeptiert sie jedoch auch alle anderen langkettigen C₁₃-Ketone, wobei das Sauerstoffatom auf beiden Seiten der Carbonylgruppe eingebaut wird; so entsteht aus 6-Tridecanon sowohl Hexansäureheptylester als auch Octansäurepentylester^[13]. Dieses Enzym setzt auch Cyclohexanon und Cyclohexanon um. Die gereinigte FAD-abhängige Steroid-Oxygenase aus *Cylindrocarpon radicicola*^[26] wandelt sowohl Progesteron in Testosteronacetat als auch Androstendion in Testololacton um; sie soll darüber hinaus auch viele andere C17- und C20-Ketosteroide metabolisieren.

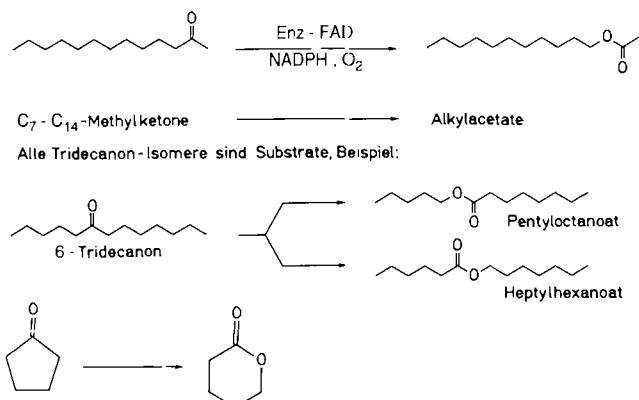


Abb. 6. Alkylmethylketon-Katabolismus durch die Tridecanon-Oxygenase von *Pseudomonas cepacia*. Bemerkenswert ist die Fähigkeit dieses Enzyms, das Sauerstoffatom auf beiden Seiten der Carbonylgruppe einzuführen zu können. Die Oxygenase ist ein dimeres Flavoprotein (2 x 55 kDa); es macht 3% des löslichen Zellproteins aus. $k_{\text{kat}} = 100 \text{ min}^{-1}$.

Luciferase ist das strukturell am besten untersuchte Flavoenzym; es ist seit ca. zwanzig Jahren aus einer Reihe von Photobakterien in reiner Form verfügbar^[27]. Das Enzym ist ein $\alpha\beta$ -Dimer. Es unterscheidet sich von anderen Flavoenzymen darin, daß es FMN nur schwach bindet und ein weiteres Enzym für die Reduktion von FMN zu FMNH₂ benötigt. FMNH₂ diffundiert dann zum aktiven Zentrum der Luciferase. Aufgrund der Tatsache, daß mit gereinigter Luciferase in Gegenwart von O₂, FMNH₂ und Tetradecanal nur ein Turnover stattfindet (wegen kompetitiver nicht-enzymatischer Autoxidation des FMNH₂), sind „steady state“-Untersuchungen sehr schwierig. Das Hauptinteresse an der Luciferase-Reaktion gilt dem „Nebenprodukt“, Emission von blaugrünem Licht ($\lambda_{\text{max}} = 490 \text{ nm}$, Quantenausbeute 0.1). Möglicherweise reagiert FMN-4a-OOH mit dem Aldehyd zu einem tetraedrischen Addukt, das dann unter C-H-Bindungsbruch nach Art einer Baeyer-Villiger-Reaktion^[28] zur entsprechenden Carbonsäure und FMN-4a-OH zerfällt. Dieses Modell erklärt jedoch nicht die Lichtemission. Hastings et al. haben vorgeschlagen, daß angeregtes FMN-4a-OH diejenige Spezies ist, die entweder selbst Licht emittiert oder die Anregungsenergie auf einen Acceptorchromophor überträgt. FMN-4a-OH entsteht nach dieser Theorie im angeregten Zustand bei der Fragmentierung über einen intramolekularen Elektronentransfer; dabei werden primär die Carbonsäure und ein Diradikal mit intramolekularer Ladungstrennung gebildet. Die

„Ladungsneutralisierung führt schließlich zum angeregten Zustand des Hydroflavins“^[29] (Abb. 7). Dieser Mechanismus wurde auch von Ghisla et al. vorgeschlagen^[30,31]. In Modelluntersuchungen mit N5-Ethyl-4a-hydroperoxyflavin wurde Chemilumineszenz mit geringen Quantenausbeuten beobachtet^[32].

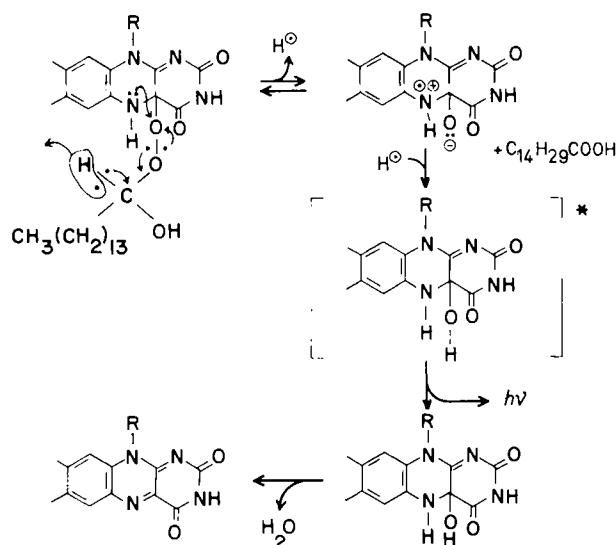


Abb. 7. Möglicher Mechanismus der bakteriellen Luciferase-Reaktion.

Das Enzym Cyclohexanon-Monooxygenase wurde in den Bodenbakterien *Nocardia*, *Pseudomonas* und *Acinetobacter* entdeckt, die auf Cyclohexanol als einziger Kohlenstoffquelle wachsen^[33]. Der Schlüsselschritt der Metaboli-

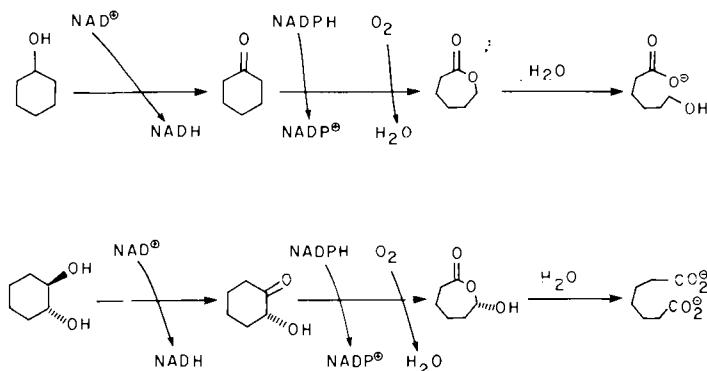


Abb. 8. Katabolismus von Cyclohexanol und *trans*-1,2-Cyclohexandiol in *Acinetobacter*. Die Cyclohexanon-Monooxygenase katalysiert den zweiten Schritt in diesem Abbauweg.

sierung cyclischer Ketone ist die Ringerweiterung nach einem Baeyer-Villiger-Mechanismus zum Siebenring-Lacton. Die anschließende Hydrolyse führt zu einer Hydroxycarbonsäure, welche zu C₂- und C₄-Metaboliten weiter abgebaut wird (Abb. 8).

4. Eigenschaften der Cyclohexanon-Monooxygenase

Das Enzym wurde erstmals von Trudgill et al.^[15] aus *Acinetobacter* und *Nocardien* isoliert, gereinigt und als gelbes, FAD-haltiges Enzym von 60 kDa charakterisiert. Die aktive Form des Enzyms ist ein Monomer, das ein FAD-Molekül pro Enzymmolekül fest, aber nichtkovalent gebunden hat. Das *Acinetobacter*-Gen wurde kürzlich in *E. coli* kloniert und exprimiert. Aus der DNA-Sequenz konnte die erste Primärstruktur eines Baeyer-Villiger-Enzyms bestimmt werden^[34]. Die Analyse der ersten 50 Amino-

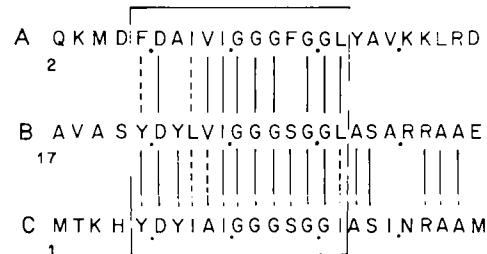


Abb. 9. Sequenzvergleich der FAD-bindenden Region von Cyclohexanon-Monooxygenase (A) sowie der Glutathion-Reduktase aus Menschenleber (B) und *E. coli* (C). Alle drei Sequenzen befinden sich nahe am NH₂-Terminus und weisen eine hohe Homologie auf.

nosäuren am NH₂-Ende offenbarte eine Homologie zu den FAD-bindenden Domänen anderer Flavoenzyme, wie der Glutathion-Reduktase, deren Kristallstruktur bekannt ist. Die Glycin-Cluster repräsentieren einen Teil der FAD-bindenden Domäne im Enzym (Abb. 9). Das UV/VIS-Spek-

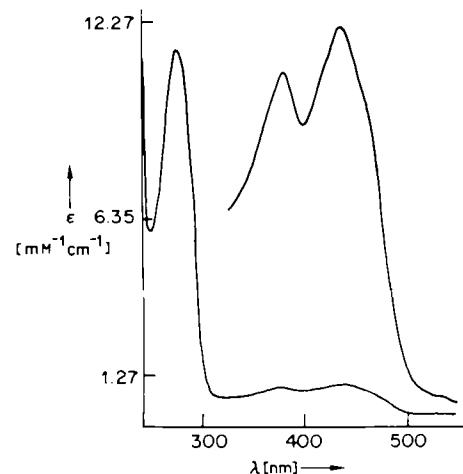


Abb. 10. UV/VIS-Spektrum der reinen Cyclohexanon-Monooxygenase. $\epsilon_{450} = 11.3 \text{ mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

trum des Enzyms zeigt Abbildung 10; man erkennt die beiden charakteristischen Absorptionsmaxima bei 375 und 450 nm.

Trudgill et al. haben nachgewiesen, daß das Enzym cyclische C₄- bis C₈-Ketone metabolisiert^[15,33] (Abb. 11); wir

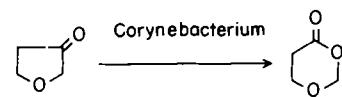
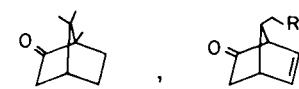
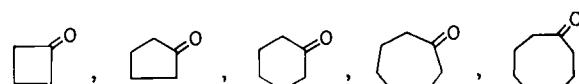
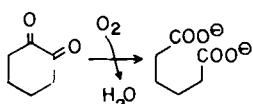
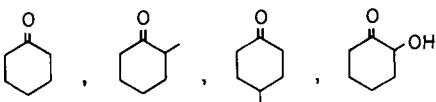


Abb. 11. Cyclische Ketone - Substrate der Cyclohexanon-Monoxygenase.

fanden, daß auch Cyclononanon in Gegenwart von O₂ und NADPH durch das reine Enzym umgesetzt wird. Das Enzym zeigt sogar eine noch breitere Spezifität; selbst acyclische Ketone und Arylketone wie Acetophenon werden akzeptiert^[34]. Das Enzym oxygeniert auch Campher, Fenchon und sogar – wenn auch langsam – Pregnelon^[35]. Mit frischem Enzym erhält man eine gute Kopplung der NADPH-Oxidation mit der Oxygenierung des Ketons, und nur 0.3% des reduzierten O₂ gehen als H₂O₂, welches vom intramolekularen Zerfall von FAD-4a-OOH herröhrt, verloren^[36]. Mit dem Altern des Enzyms, mit dem eine Denaturierung im Bereich des aktiven Zentrums einhergeht, steigt der Anteil der ungekoppelten O₂-Reduktion auf 2-3% des Umsatzes an.

4.1. Ein Biokatalysator für die Baeyer-Villiger-Oxidation

Die Neigung zur Umlagerung beim Prozeß der Sauerstoffinsertion wurde an zwei Substrattypen untersucht. Bei der Umsetzung von 2-Methylcyclohexanon wird Sauerstoff nur zwischen Carbonylgruppe und höher substituiertes Kohlenstoffatom eingeschoben (Abb. 1)^[37]. Phenylacetan wird zu Benzylacetat umgesetzt, was die ausschließliche Wanderung der Benzylgruppe^[34], in Übereinstimmung mit der nichtenzymatischen Reaktion von Phenylacetan mit Trifluorperessigsäure, widerspiegelt (Abb. 12). Die Einwir-

kung von Cyclohexanon-Monoxygenase auf Phenylacetaldehyd führt zur Wanderung sowohl des Wasserstoffatoms als auch der Benzylgruppe (2:1 Wasserstoff: Benzyl), und man erhält 65% Phenylsuccinsäure, 23% Benzylalkohol und 12% Benzylformiat. Ein umgekehrtes Bild (7:1 bis 2:1 Benzyl: Wasserstoff) ergibt sich bei der entsprechenden nichtenzymatischen Behandlung mit verschiedenen Persäuren^[38]. Aliphatische Aldehyde, z. B. Butyraldehyd (Abb. 12), reagieren sowohl mit Cyclohexanon-Monoxygenase^[34] als auch mit Peroxid-Reagentien^[7] nur zu den entsprechenden Carbonsäuren. Bei der Oxidation der Aldehyde durch dieses Enzym ist im Gegensatz zur Luciferase-Reaktion keine Lichtemission entdeckt worden. Die molekularen Grundlagen für diesen Unterschied sind noch unklar.

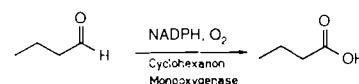
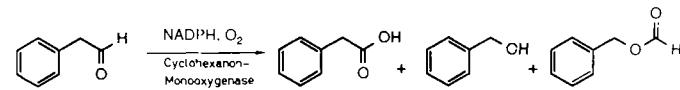
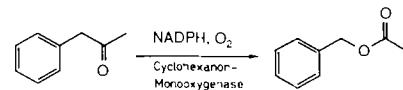
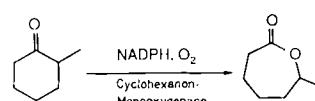
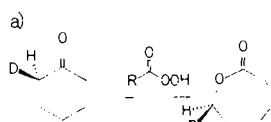


Abb. 12. Die Umlagerungsrichtung bei der Sauerstoffinsertion durch die Cyclohexanon-Monoxygenase gleicht in der Regel der bei den entsprechenden nichtenzymatischen Reaktionen, z. B. mit Trifluorperessigsäure. Entgegengesetzte Präferenzen beruhen möglicherweise auf sterischen Einflüssen im aktiven Zentrum.

Die nichtenzymatische Baeyer-Villiger-Reaktion verläuft unter Retention der absoluten Konfiguration am wandernen Kohlenstoffzentrum^[39]. Dies ergab auch die Umwandlung von (2R)-[D₁]Cyclohexanon, bei der, wie NMR-Studien ergaben, unter Retention der Konfiguration das entsprechende Monodeuteriolacton entsteht (Abb. 13a)^[37]. Um eine Reaktionsfolge Enolisierung, Epoxidierung, Umlagerung (Abb. 13b unten) ausschließen zu können, wurde das Enzym mit 2,2,6,6-Tetradeuteroiocyclohexanon inkubiert und die deuterierten Lactone mittels GC/MS analysiert; da kein Deuteriumverlust eintritt, ist dieser Mechanismus auszuschließen, und alles spricht für den in Abbildung 13b oben gezeigten Weg. Alle Befunde stützen die These, daß die Cyclohexanon-Monoxygenase ihre Substrate nach Art einer Baeyer-Villiger-Oxidation umsetzt, wobei ein tetraedrisches Addukt als Intermediat auftritt.

Für den Nachweis, daß nicht etwa H₂O₂, das durch die 2e⁻-Reduktion von O₂ entsteht, das Oxidationsagens ist, wurde das Enzym mit NADP⁺, H₂O₂ und Cyclohexanon inkubiert: Es entstand kein Lacton^[40]. Dieser Befund und die Ergebnisse spektroskopischer Untersuchungen der „pre-steady state“-Kinetik, sprechen für die Beteiligung



b)

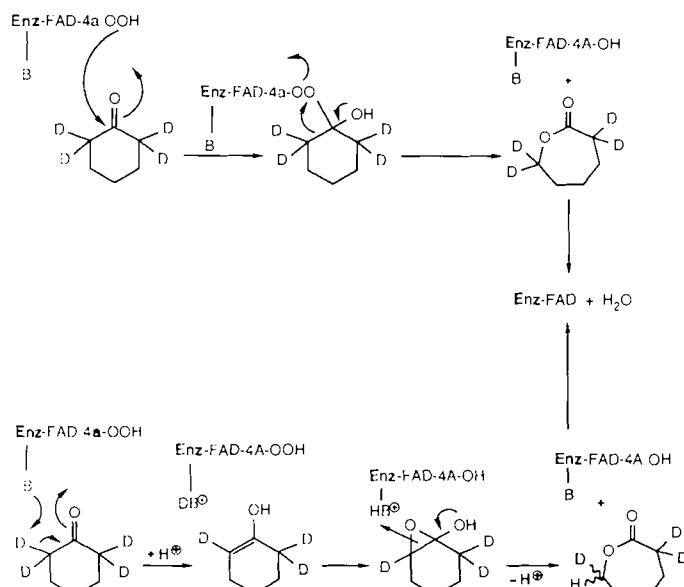


Abb. 13. a) Die Wanderung des Kohlenstoffzentrums verläuft bei der enzymatischen wie bei der nichtenzymatischen Baeyer-Villiger-Reaktion unter Retention der Konfiguration. b) Die Sauerstoffinsertion soll über die Bildung eines tetraedrischen Intermediates ablaufen, das zu den Produkten zerfällt (oben). Untersuchungen mit 2,2,6,6-[D₄]Cyclohexanon sprechen gegen einen Verlauf über Enolisierung und Epoxidierung (unten).

eines enzymgebundenen FAD-4a-OOH-Intermediates^[41]. Eine entsprechende FMN-4a-OOH-Spezies spielt in chemischer und kinetischer Hinsicht bei der Luciferase-Katalyse eine wichtige Rolle^[23]. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde der in Abbildung 14 dargestellte Mechanismus für die Reaktion der Cyclohexanon-Monoxygenase

formuliert^[40]. NADPH bindet an den Enzym-FAD-Komplex (E-FAD) und reduziert diesen sehr schnell ($> 50000 \text{ min}^{-1}$). Das entstandene FADH₂ seinerseits wird in Gegenwart von O₂ noch schneller reoxidiert und bildet FAD-4a-OOH, das deprotoniert wird (pH-Optimum des Enzyms = 9.0) und als Nucleophil am Keto- oder Aldehydkohlenstoffatom angreift. Das tetraedrische Addukt zersetzt sich unter Umlagerung (Alkyl- oder H-Wanderung und Spaltung der schwachen O-O-Bindung). Man erhält den Ester (oder die Säure) und FAD-4a-OH, welches unter Wasserabspaltung wieder FAD ergibt.

Man kann kompliziertere Varianten dieses Mechanismus formulieren, wobei Flavin-4a-OOH nicht die sauerstoffübertragende Spezies ist, sondern nur ein Vorläufer aktiverer Verbindungen, z. B. eines Flavin-oxaziridins, eines cyclischen 4a,10a-Peroxids, eines Flavinperepoxids oder eines Flavincarbonyloxids mit einem geöffneten zentralen Ring, um nur einige zu nennen (Abb. 15). Es gibt jedoch bisher keinen einzigen Hinweis auf die Existenz dieser Spezies, und es ist daher sinnvoll, an Flavin-4a-hydroperoxid festzuhalten. Es bleibt allerdings die Frage, ob seine Oxidationskraft ausreicht. Aus Untersuchungen von Bruice et al. existieren zwar Daten hinsichtlich der N- oder S-Oxidation, jedoch nicht für Baeyer-Villiger-Reaktionen^[41]. Für N- und S-Oxidationen ist das N5-Alkyl-4a-hydroperoxyflavin nahezu 2×10^5 mal reaktiver als *tert*-Butylhydroperoxid. Struktur-Reaktivitäts-Studien ergaben, daß

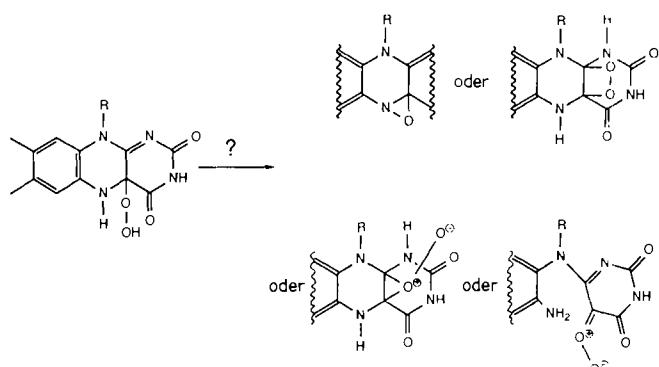


Abb. 15. Weitere Möglichkeiten für sauerstoffübertragende Intermediates, abgeleitet vom FAD-4a-OOH. Es gibt jedoch bisher keine konkreten Hinweise auf diese Spezies.

sich die Flavinhydroperoxide gut in eine Reihe von aktivierte Peroxiden und Persäuren einfügen^[41]; dabei wurde das Sauerstoffübertragungspotential dieser Verbindungen mit den pK_a-Werten der entsprechenden OH-Verbindungen korreliert.

4.2. Heteroatom-Oxidationen durch Cyclohexanon-Monoxygenase

Angesichts der Reaktivität von Flavin-4a-OOH bei der N- und S-Oxidation stellte sich die Frage, ob auch Baeyer-Villiger-Enzyme diese Reaktion katalysieren. Ferner war zu erwarten, daß eine Alkylhydroperoxyde äquivalente Verbindung bezüglich der Sauerstoffübertragung eine ambidente Reaktivität zeigt: als Nucleophil greift sie Carbonylkohlenstoffatome an und als Elektrophil nucleophile

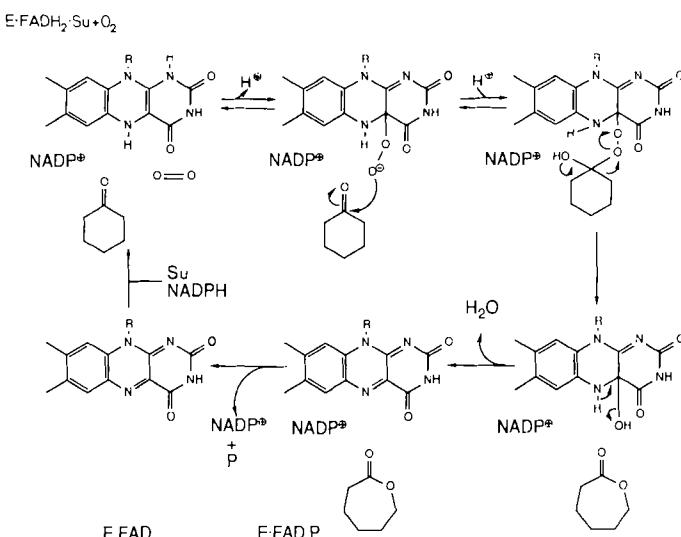


Abb. 14. Vorschlag für den Mechanismus der Sauerstoffinsertion durch die Cyclohexanon-Monoxygenase. Die Oxidation des reduzierten Flavins führt zum E-FAD-4a-OOH, das als Sauerstoffdonor fungiert. Die Eliminierung von Wasser regeneriert oxidiertes Flavin für den nächsten Katalysezyklus.

Substrate. In der Tat wird Triphenylphosphit durch Cyclohexanon-Monoxygenase zu Triphenylphosphat oxidiert; auch das Iodid-Ion, das klassische Reagens für die titrimetrische Peroxidbestimmung^[42], wird oxidiert.

Das Enzym akzeptiert auch Sulfide als Substrate. Thiacyclohexan wird mit 88% des v_{max} von Cyclohexanon umgesetzt ($K_m = 24 \mu\text{M}$)^[40]. Ist genügend Sulfoxid entstanden, geht die Oxidation weiter bis zum Sulfon. Die Michaelis-Konstante K_m ist für das Sulfoxid ($K_m = 170 \mu\text{M}$) ca. siebenmal größer als für Thiacyclohexan, und v_{max} beträgt 60% des Wertes bei Cyclohexanon^[34] (Abb. 16a). Diese Er-

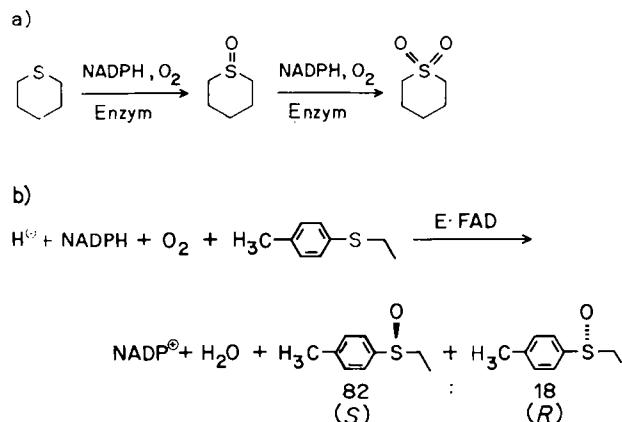


Abb. 16. a) Die Oxidation von Sulfiden zu Sulfonen verläuft in zwei Schritten über das isolierbare Sulfoxid. b) Die Oxidation durch die Cyclohexanon-Monoxygenase ist enantioselektiv. Das (S)-Sulfoxid wird in einem Verhältnis von ca. 4:1 bevorzugt gebildet.

gebnisse entsprechen qualitativ denen der Reaktion von Sulfiden mit Peroxiden; ein Äquivalent des Oxidationsmittels führt zum Sulfoxid, zwei führen zum Sulfon^[1,43]. Zur Untersuchung der Stereochemie der enzymatischen Sulfoxidation wurde das Enzym mit Ethyl-*p*-tolylsulfid inkubiert, wobei 82% des (S)-Sulfoxides gefunden wurden. Das (S)-Produkt wird also nur mit einer Selektivität von 4:1 kinetisch bevorzugt gebildet^[44] (Abb. 16b). Weitere Studien zu diesem Problem sind nicht bekannt.

Erste Experimente zur Klärung der Frage, ob Cyclohexanon-Monoxygenase die Sulfoxidation oder die Baeyer-Villiger-Oxidation bevorzugt, wurden mit Thiacyclohexanon-Isomeren durchgeführt. 3- und 4-Thiacyclohexanon wurden vom Enzym ohne merkliche Schwefeloxidation in die entsprechenden Lactone überführt (Abb. 17)^[36]. Ursache könnte die bevorzugte Bindung der Carbonylfunktion an das Flavinperoxid sein.

Allylphenylsulfid lässt sich durch die Cyclohexanon-Monoxygenase glatt zum Sulfoxid oxidieren, ohne daß eine Inaktivierung des Enzyms durch eine 2,3-sigmatrope

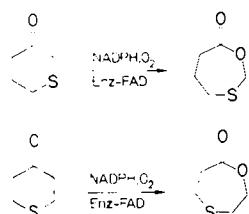


Abb. 17. Die enzymatische Oxidation von Thiacyclohexanon ist regioselektiv; die Sauerstoffinsertion findet bevorzugt in Nachbarstellung zum Carbonylkohlenstoffatom statt.

Umlagerung des Allylsulfoxids auftritt (Abb. 18a)^[34]. Das entsprechende Selenid wurde ebenfalls glatt und ohne Inaktivierung des Enzyms oxidiert. Wurde dagegen Phenylpropargylselenid enzymatisch umgesetzt, so war α -Phenylselenoacrolein das einzige Reaktionsprodukt (Abb. 18b)^[45]. Es ist wahrscheinlich, daß dieses durch enzymati-

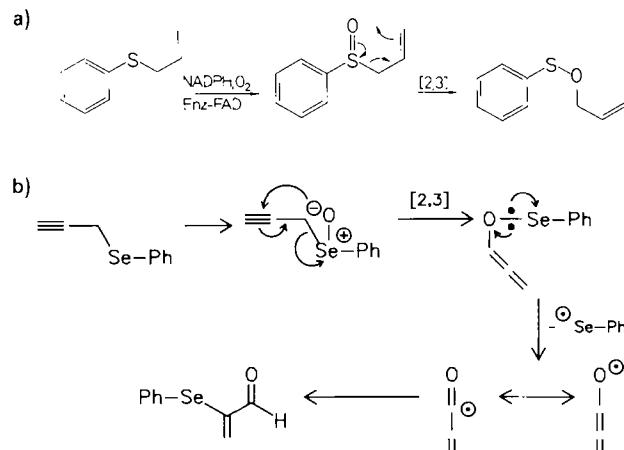


Abb. 18. a) Die Oxidation von Allylphenylsulfid führt nicht zur Inaktivierung des Enzyms (durch 2,3-sigmatrope Umlagerung zu einem Elektrophil). b) Die enzymatische Oxidation von Phenylpropargylselenid [45] führt zum gleichen Produkt wie die entsprechende Ozonoxidation [46].

sche Selenoxygenierung, anschließende 2,3-sigmatrope Umlagerung zum Allenylselenensäureester und schließlich dessen Fragmentierung und Rekombination entstanden ist. Dieser Reaktionsweg ist von der Umsetzung des gleichen Selenids mit Ozon in wasserfreien organischen Lösungsmitteln bekannt^[46].

Diese Ergebnisse zeigen die Vielseitigkeit der Cyclohexanon-Monoxygenase bei der Übertragung von elektrophilem Sauerstoff auf elektronenreiche Heteroatomsubstrate. Um nun den nucleophilen Charakter der sauerstoffübertragenden Spezies, wie er in der Baeyer-Villiger-Reaktion zum Ausdruck kommt, zu überprüfen, verwendeten wir Borsubstrate, speziell Boronsäurederivate.^[34] Alkyl- und Arylboronsäuren werden glatt in die entsprechenden Alkohole überführt. Primärprodukte dieser enzymatischen Reaktion sind hydrolysesabile Borate (Abb. 19).

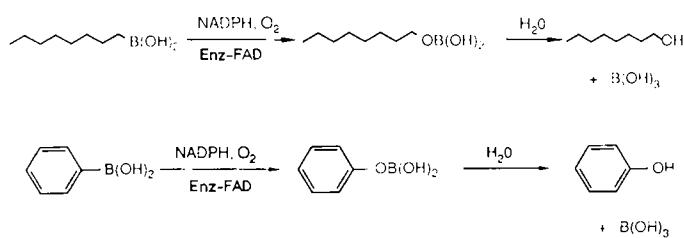


Abb. 19. Cyclohexanon-Monoxygenase ist das erste Enzym, das eine Bor-Oxidation katalysiert. Boronsäuren werden via Borate in die entsprechenden Alkohole überführt.

Ein Beispiel: *n*-Octylboronsäure wird zu *n*-Octanol und Borsäure umgesetzt. Bemerkenswert ist, daß dabei K_m kleiner (2.5 μM gegenüber 6 μM) und k_{kat} größer (580 min^{-1} gegenüber 400 min^{-1}) als bei Cyclohexanon als Substrat sind; *n*-Octylboronsäure erwies sich als das

bisher effektivste Substrat der Cyclohexanon-Monoxygenase ($k_{\text{kat}}/K_m = 3.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Dieses erste Beispiel einer enzymatischen Bor-Oxidation scheint analog einem Baeyer-Villiger-Prozeß abzulaufen: Zunächst greift das Flavinhydroperoxid-Anion am Bor an; das entstehende Addukt zerfällt anschließend unter Wanderung des Restes R und Spaltung der O–O-Bindung (Abb. 20). Diese Sauerstoffinsertion erfolgt auch nichtenzymatisch so glatt, daß sie sowohl in der Synthese als auch für die quantitative Analyse von Organoborverbindungen genutzt wird^[12, 47]. Boronsäuren könnten somit als Sonden zur Untersuchung enzymatischer *nucleophiler Sauerstoffüberträger*^[34] genutzt werden.

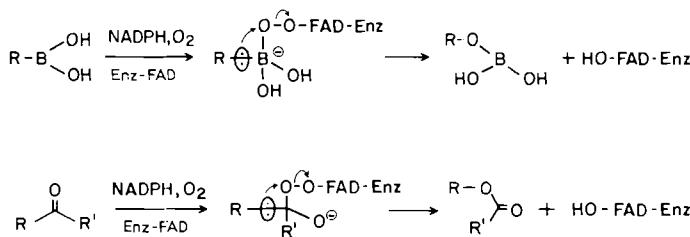


Abb. 20. Postulierter Mechanismus der Oxidation von Boronsäuren durch Cyclohexanon-Monoxygenase über ein tetraedrisches Peroxybor-Addukt und anschließende Alkyl- oder Arylgruppenwanderung (oben) .. analog einem Baeyer-Villiger-Prozeß (unten).

Wenn enzymatische Boronsäure-Oxidationen tatsächlich nach Art der Baeyer-Villiger-Reaktion ablaufen, dann sollte die Konfiguration des vom Bor zum Sauerstoff wandernden Restes R erhalten bleiben. Diese Voraussage wurde mit (S,S)-2-Methylcyclohexylboronsäure bestätigt. Die enzymatische Oxidation lieferte unter vollständiger Retention der Konfiguration der wandernden Cyclohexylgruppe (S,S)-2-Methylcyclohexanol^[48a] (Abb. 21). Dieser Befund gleicht dem Resultat der Oxidation von (S,S)-2-Methylcyclohexylboronsäuredimethylester mit H_2O_2 in alkalischer Milie^[48b].

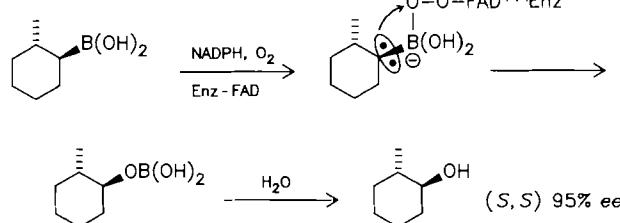


Abb. 21. Die enzymatische Umwandlung von Boronsäuren zu Boraten verläuft unter Retention der Konfiguration am wandernden Rest. Inkubiert man das Enzym mit (S,S)-2-Methylcyclohexylboronsäure, so erhält man nach Hydrolyse das entsprechende (S,S)-2-Methylcyclohexanol.

4.3. Inaktivierung von Cyclohexanon-Monoxygenase durch Thiolactone und Thiocarbonat

Im Gegensatz zu den 3- und 4-Thiacyclohexanonen führt die Umsetzung von 2-Thiacyclohexanon mit Cyclohexanon-Monoxygenase zu dessen Inaktivierung^[36]. Dieses Thiacyclohexanon-Isomer ist ein Thiolacton und selbst

ein acylierendes Agens. Die Inaktivierung von Cyclohexanon-Monoxygenase benötigt jedoch NADPH und O_2 , was klar für eine Suizidinaktivierung spricht. In Konkurrenz zur Inaktivierung des Enzyms findet allerdings auch eine Umsetzung des Thiolactons zu Produkten statt. Mit γ -Thiobutyrolacton sind pro Inaktivierung 33 Umsetzungen beobachtet worden, mit Ethylenmonothiocarbonat sogar 110^[36]. Experimente mit $[^{35}\text{S}]$ - γ -Thiobutyrolacton zeigten, daß die Inaktivierung des Enzyms das Ergebnis eines stöchiometrischen Einbaus von einem radioaktiven Schwefelatom pro Enzymmolekül ist. Die Struktur dieses kovalenten Adduktes wurde jedoch bisher nicht aufgeklärt. Drei Reaktionswege sind denkbar: A) Sauerstoffübertragung auf den Schwefel unter Bildung eines Acylsulfoxides I, ein reaktives Acylierungsreagens; B) Sauerstoffinsertion nach Art einer Baeyer-Villiger-Reaktion mit dem Ergebnis eines Sulfensäure-Carbonsäure-Anhydrids III; C) Bildung eines tetraedrischen Adduktes und Zersetzung zum γ -Mercaptoperester II (Abb. 22a). Die Wege A und B führen zu

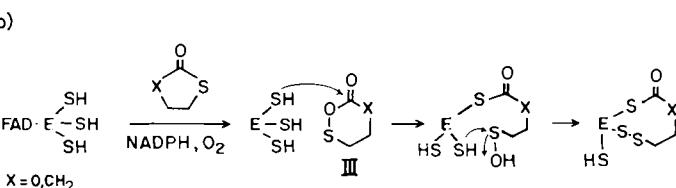
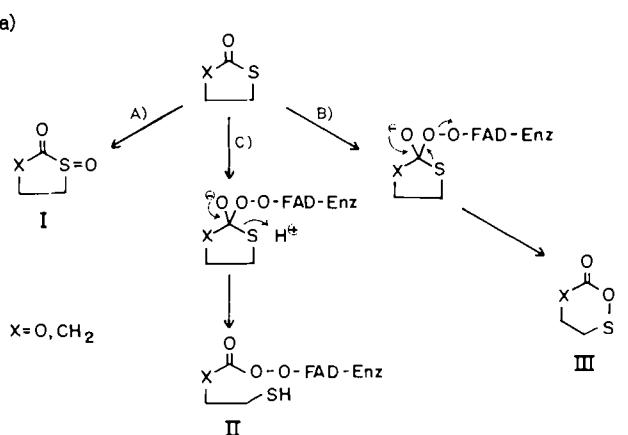


Abb. 22. Mögliche Mechanismen der Enzyminaktivierung durch Thiolacton-Substrate. a) Drei Wege der Oxidation des Substrates zu extrem reaktiven Elektrophilen I–III. b) Acylierung des Enzyms durch III führt zu einem neuen Elektrophil, das mit dem Protein eine Vernetzungsreaktion zu einem Enzym-disulfid-thioester-Addukt eingehen kann.

Spezies, die leicht unter Acylierung weiterreagieren, wobei der elektrophile Sulfensäurerest freigesetzt wird, der in einer Vernetzungsreaktion mit dem Protein (z. B. unter Bildung einer Disulfidbrücke) reagieren kann (Abb. 22b). Dieser Reaktionsweg könnte über Cyclohexanon-Monoxygenase hinaus von Bedeutung sein. Thiocarbamat-Herbizide beispielsweise werden in Pflanzen durch Oxygenasen, wahrscheinlich vom Cytochrom-P₄₅₀-Typ, in Acylsulfoxide umgewandelt, die bei tiefen Temperaturen isolierbar sind; sie sind die aktiven acylierenden und damit herbiziden Agentien^[49, 50]. Möglicherweise beruht auch die Toxizität des antihypertensiven und diuretischen Spirono-

lactons **IV** auf gewebespezifischen (Nebenniere und Niere), enzymatischen S-Oxygenierungen (Abb. 23)^[51].

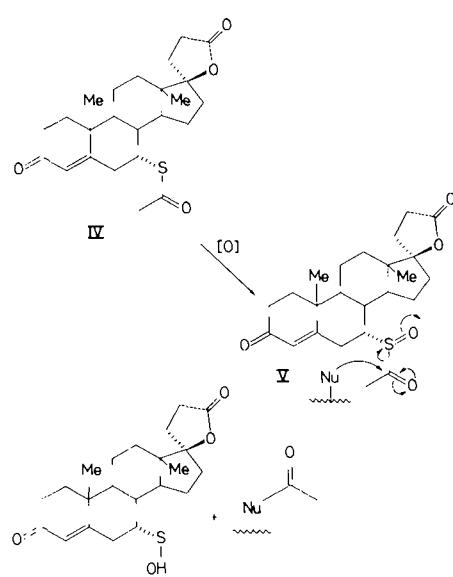


Abb. 23. Mögliche Wirkungsweise des Medikaments Spironolacton **IV**. Die enzymatische S-Oxygenierung führt zu einem Acylsulfoxid **V**, das mit einem Nucleophil weiterreagiert; dabei entstehen eine acyierte Spezies und eine mit einem elektrophilen Sulfensäurerest.

Tabelle 4. Substratspektrum der Cyclohexanon-Monoxygenase von *Acinetobacter*.

	K_m [μM]	k_{cat} [min^{-1}]
	6	400
	16	455
	-	86
	350	68
	25	159
	29	521
	21	491
	10	692
	2.5	660
	24	396
	30	373
	360	228
	2500	196
	-	50

5. Schlußbemerkungen

Cyclohexanon-Monoxygenase, eine gut untersuchte Flavoprotein-Monoxygenase, die als Katalysator der Baeyer-Villiger-Reaktion für den Abbau von Cycloalkanen im bakteriellen Metabolismus fungiert^[33], hat sich als ein bemerkenswert vielseitiges Oxygenierungsreagens erwiesen. Im aktiven Zentrum enthält das Enzym fest gebundene FAD-4a-OOH, das als nucleophiler und elektrophiler Sauerstoffüberträger reagiert – je nachdem, ob das Substrat elektronenarm oder elektronenreich ist. Eine repräsentative Auswahl möglicher Substrate der Cyclohexanon-Monoxygenase ist in Tabelle 4 zusammengestellt; die k_{cat} -Werte reichen von 50 min^{-1} bis ca. 700 min^{-1} . Es scheint, als ob nahezu alle Substrate, die das aktive Zentrum erreichen, vom Enzym oxygeniert werden können. Es gibt natürlich Ausnahmen (siehe Tabelle 5), darunter 1,3-Cyclohexandion, 2-Cyclohexenon, 4-Phenylcyclohexanon, 2-Butanon und Triphenylphosphan sowie Ketone wie Carvon, Pulegon und Menthon.

Die Regioselektivität der Baeyer-Villiger-Umlagerung ist nur in einigen wenigen Fällen untersucht, scheint jedoch vorhersagbar zu sein. Bei 2-Methylcyclohexanon und 2-Methylcyclohexylboronsäure ist Retention der Konfiguration am wandernden Rest gesichert. Die Lactonisierung

Tabelle 5. Gegenüberstellung einer Auswahl von typischen Verbindungen, deren Oxygenierung von Cyclohexanon-Monoxygenase katalysiert wird oder nicht.

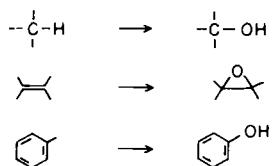
Substrate	keine Substrate

von 4-Methylcyclohexanon verläuft unselektiv (NMR-Analyse: *Y.-C. J. Chen, P. Lodi, C. Walsh*, unveröffentlicht)^[32]; D- und L-Campher werden gleichermaßen umgesetzt. (*R*)-2-Methylcyclohexanon wird schneller umgesetzt als das (*S*)-Derivat (Verhältnis 2:1)^[39].

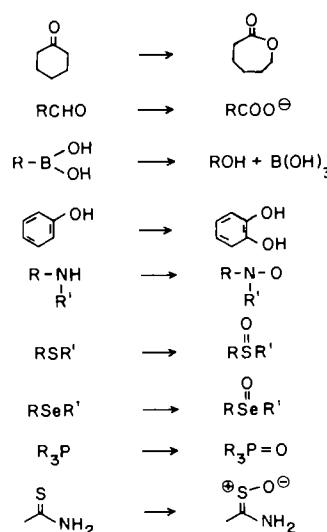
Wiederholte Versuche, olefinische Doppelbindungen, z. B. von Dimethylstyrol, von Enaminen oder Enolethern, zu epoxidieren, brachten keinen Erfolg (*Y.-C. J. Chen, J. A. Latham, C. Walsh*, unveröffentlicht). Es stellt sich daher die Frage, ob die Reaktivität des enzymgebundenen FAD-4a-OOH (oder einer reaktiven Folgespezies) für Epoxidierungen überhaupt ausreicht. In Tabelle 6 sind Oxi-

Tabelle 6. Zusammenstellung von Oxidationen, die von eisen- oder flavinabhängigen Monooxygenasen katalysiert werden. Doppelbindungen werden von flavinabhängigen Monooxygenasen nicht epoxidiert.

Eisenabhängige Monooxygenasen



Flavinabhängige Monooxygenasen



dationen zusammengestellt, die von eisen- und flavinabhängigen Monooxygenasen katalysiert werden. Eisenabhängige Monooxygenasen epoxidieren olefinische und aromatische Doppelbindungen (die dabei zunächst gebildeten Dihydroarenoxide lagern sich zu Phenolen um) und hydroxylieren inaktivierte sp^3 -Kohlenstoffzentren (z. B. in Campher). Flavinabhängige Monooxygenasen können offenbar Olefine nicht epoxidieren. Alle bisher als Baeyer-Villiger-Enzyme charakterisierten Proteine sind Flavoproteine. Es ist anzunehmen, daß sie auch bei vielen anderen biologischen Baeyer-Villiger-Transformationen komplexerer Naturstoffe beteiligt sind.

Eingegangen am 22. April,

veränderte Fassung am 31. August 1987 [A 660]
Übersetzt von Dipl.-Chem. Jens Eckstein, Konstanz

- [1] J. B. Lee, B. C. Uff, *Q. Rev.* 21 (1967) 429.
- [2] C. Rugero, J. C. Edwards in D. Swern (Hrsg.): *Organic Peroxides*, Wiley-Interscience, New York 1970, S. 199.
- [3] H. Mimoun, *Angew. Chem.* 94 (1982) 750; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 21 (1982) 734.
- [4] H. A. Milas, S. A. Harris, P. C. Panagiotakos, *J. Am. Chem. Soc.* 61 (1939) 2430.
- [5] D. H. R. Barton, W. D. Ollis, J. F. Stoddart (Hrsg.): *Comprehensive Organic Chemistry*, Pergamon Press, Oxford 1979, S. 920.
- [6] R. Criegee, W. Schnorrenberg, J. Becke, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 565 (1949) 7.
- [7] R. Hiatt in D. Swern (Hrsg.): *Organic Peroxides*, Wiley-Interscience, New York 1970, S. 1.
- [8] C. M. Hassall, *Org. React.* 9 (1957) 73.
- [9] S. W. Fox, E. H. Polak, M. W. Bullock, Y. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* 73 (1951) 4979.
- [10] H. W. Heine, H. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* 73 (1951) 1361.
- [11] E. Spath, M. Pailer, M. Schmid, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 74 (1941) 1552.
- [12] H. E. Conrad, R. Dubus, M. J. Namvedt, I. C. Gunsales, *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 495.
- [13] L. N. Britton, A. J. Markavetz, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 8561.
- [14] M. A. Rahum, C. J. Sih, *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 3615.
- [15] N. A. Donoghue, D. B. Norris, P. W. Trudgill, *Eur. J. Biochem.* 63 (1976) 175.
- [16] K. H. Nealson, J. W. Hastings, *Microbiol. Rev.* 43 (1979) 496.
- [17] C. A. Townsend, S. B. Christiansen, S. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 6154.
- [18] C. Walsh: *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Freeman, San Francisco 1979, S. 501.
- [19] B. Entsch, D. P. Ballou, V. Massey, *J. Biol. Chem.* 251 (1976) 2550.
- [20] T. A. Dix, S. J. Benkovic, *Biochemistry* 24 (1985) 5839.
- [21] R. C. Rosenberg, W. Lovenberg in M. Youdim, W. Lovenberg, D. F. Sharman, J. R. Lagrado (Hrsg.): *Essays in Neurochemistry and Neuropharmacology*, Wiley, New York 1980, S. 163.
- [22] C. Walsh, *Acc. Chem. Res.* 13 (1980) 148.
- [23] S. Ghisla, J. W. Hastings, V. Favaudon, J. M. Lhoste, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 5860.
- [24] C. A. Yu, J. C. Gunsalus, *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 6149.
- [25] H. J. Ougham, D. G. Taylor, P. W. Trudgill, *J. Bacteriol.* 153 (1983) 140.
- [26] E. Itagake, M. Katagiri in R. Bray (Hrsg.): *Flavins and Flavoproteins*, de Gruyter, Berlin 1984, S. 639.
- [27] D. H. Cohn, R. C. Ogden, J. N. Abelson, T. O. Baldwin, K. H. Nealson, M. I. Simon, A. J. Mileham, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 120.
- [28] J. W. Hastings, K. H. Nealson, *Annu. Rev. Microbiol.* 31 (1977) 549.
- [29] J. W. Hastings, C. J. Potrikus, S. C. Gupta, M. Kurfurst, J. C. Makemson, *Adv. Microbial Physiol.* 26 (1985) 236.
- [30] S. Ghisla, P. Macheroux, J. Eckstein in D. McCormick, D. Edmondson (Hrsg.): *Flavins and Flavoproteins*, de Gruyter, Berlin 1987.
- [31] P. Macheroux, S. Ghisla, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 33 (1985) 785.
- [32] T. C. Bruice in V. Massey, C. Williams (Hrsg.): *Flavins and Flavoproteins*, Elsevier/North Holland, New York 1982, S. 265.
- [33] P. W. Trudgill in D. T. Gibson (Hrsg.): *Microbial Degradation of Organic Compounds*, Marcel Dekker, New York 1984, S. 131.
- [34] B. P. Branchaud, C. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 2153.
- [35] O. Abril, *Dissertation*, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA 1983.
- [36] J. A. Latham, C. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 3421.
- [37] J. Schwab, W. B. Li, L. P. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 4800.
- [38] M. J. Rayer, M. Beugelmas-Verrier, *C. R. Acad. Sci. Ser. C* 272 (1971) 1818.
- [39] J. Schwab, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 1976.
- [40] C. C. Ryerson, D. P. Ballou, C. Walsh, *Biochemistry* 21 (1982) 2644.
- [41] T. C. Bruice, J. B. Noar, S. S. Ball, U. V. Venkataram, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 2452.
- [42] S. Sigall: *Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups*, Wiley-Interscience, New York 1979, S. 325.
- [43] B. Plesnicar in W. Trahanovsky (Hrsg.): *Oxidation in Organic Chemistry*, Academic Press, New York 1978, S. 211.
- [44] D. Light, D. Waxman, C. Walsh, *Biochemistry* 21 (1982) 2490.
- [45] J. A. Latham, B. P. Branchaud, Y.-C. J. Chen, C. Walsh, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1986, 528.
- [46] H. J. Reich, K. E. Yelm, S. Wallowitz, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 2503.
- [47] R. D. Strahm, M. F. Hawthorne, *Anal. Chem.* 32 (1960) 530.
- [48] a) J. A. Latham, C. Walsh, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1986, 527; b) H. C. Brown, B. Singaram, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 1797.
- [49] M. M. Lay, J. P. Hubbell, J. E. Casida, *Science (Washington)* 189 (1975) 287.
- [50] Y. S. Chen, J. E. Casida, *J. Agric. Food Chem.* 27 (1979) 1601.
- [51] R. H. Menard, T. M. Guenther, H. Kon, J. R. Gillette, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 1726.
- [52] I. J. Jakovac, B. J. Jones, *J. Org. Chem.* 44 (1979) 2165.
- [53] Y.-C. J. Chen, O. Peoples, C. Walsh, *J. Bacteriol.*, im Druck.