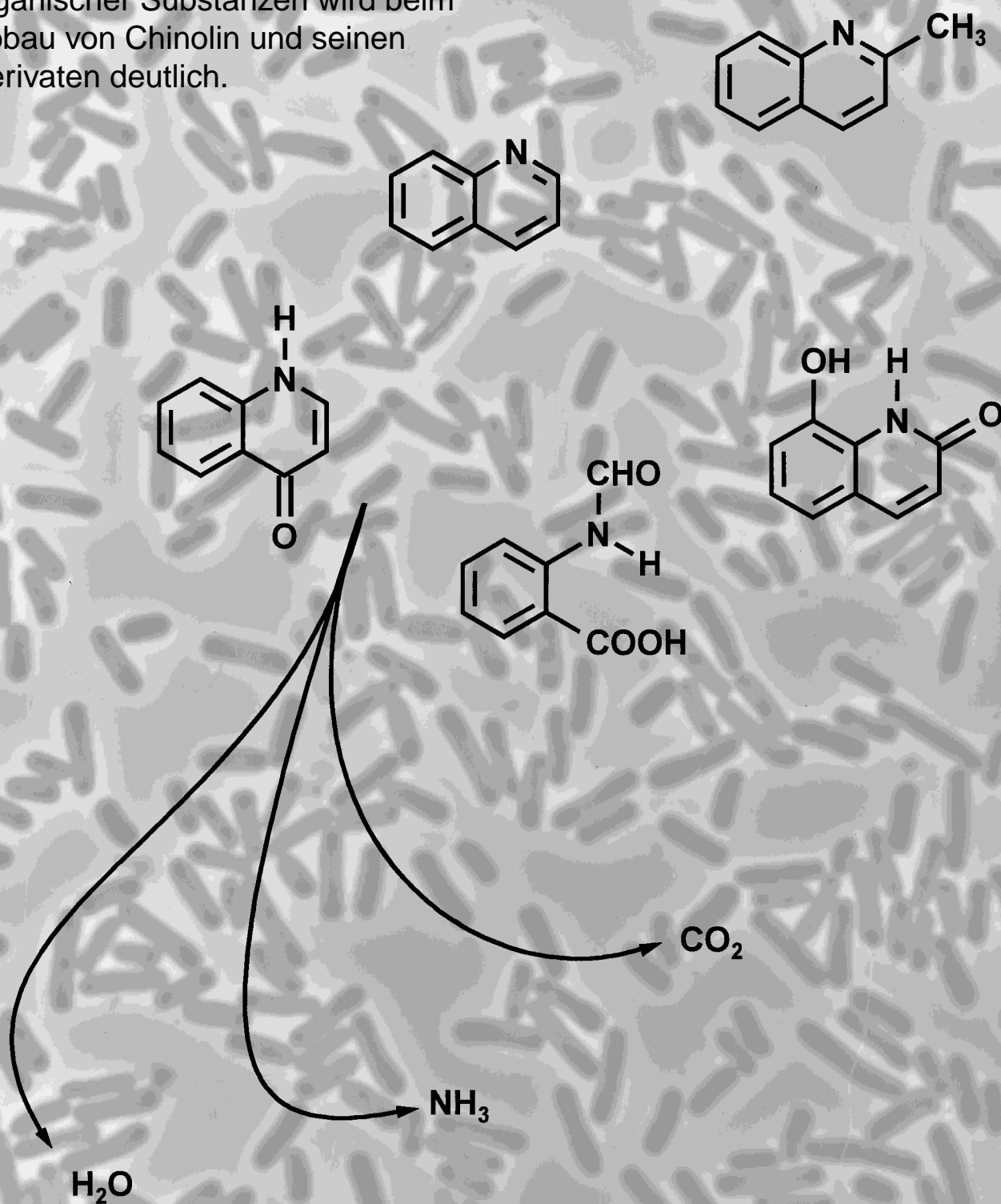


Das vielfältige Potential von Mikroorganismen für den Metabolismus organischer Substanzen wird beim Abbau von Chinolin und seinen Derivaten deutlich.



Eine Reihe von aeroben Bakterien verwendet diese Substrate als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle, wobei der Abbau bis zur Mineralisation führt.

Der bakterielle Abbau von Chinolin und seinen Derivaten – Abbauwege und Biokatalysatoren

**Susanne Fetzner,* Barbara Tshisuaka, Franz Lingens, Reinhard Kappl und
Jürgen Hüttermann**

In memoriam Adolf Butenandt und Heinrich Hellmann

Bakterien haben als Folge des von der biotischen und der abiotischen Welt ständig ausgeübten Selektionsdrucks ein erstaunlich vielfältiges Potential entwickelt, organische Verbindungen natürlicher und xenobiotischer Herkunft umzusetzen und sogar zu mineralisieren. Als Modellsubstanzen zur Untersuchung des bakteriellen Katabolismus von Heteroarenen wurden einige Derivate des Chinolins (2,3-Benzopyridin) ausgewählt. Trotz der sehr begrenzten Zahl organischer Nährsubstrate wurden mehrere Abbauwege gefunden, die einmal mehr

die Vielfalt des bakteriellen Stoffwechsels veranschaulichen. Bei den aeroben Abbauwegen fanden sich aber auch Gemeinsamkeiten wie enzymatisch katalysierte Hydroxylierungen, die das jeweilige Substrat für den Angriff ringspaltender Enzyme vorbereiten. Im Bemühen um ein umfassendes Verständnis enzymkatalysierter Reaktionen müssen Disziplinen wie Mikrobiologie, Biochemie, Biophysik und molekulare Genetik eng zusammenarbeiten. Um die molekularen Grundlagen der Reaktivität aufzuklären, ist es unerlässlich, die Reaktionsmecha-

nismen von Biokatalysatoren zu verstehen und Einblick in die dreidimensionale Struktur von Enzymproteinen zu gewinnen. Dieses Wissen ermöglicht es nicht nur, die Stoffwechselprozesse auf molekularer Ebene zu verstehen, sondern auch die potentielle Anwendung von Biokatalysatoren in der Industrie einzuschätzen.

Stichwörter: Chinoline • Enzyme • Enzymkatalyse • Heterocyclen • Metabolismus

1. Einleitung

Chinolin **10** und davon abgeleitete N-Heterocyclen kommen ubiquitär vor und verschmutzen die Umwelt. Sie werden vor allem bei der Verarbeitung fossiler Energieträger und aus Holzschutzmitteln auf Kresolbasis freigesetzt. Chinoline sind, im Unterschied zu anderen in Teer und Erdöl vorkommenden Azarenen, relativ gut wasserlöslich. Ihr Vorkommen im Gewebe von Fischen,^[1, 2] in Sedimenten,^[1, 3, 4] in der Stadtluft^[1, 4] sowie in Böden und im Grundwasser, besonders in der Nähe von Deponien mit Azaren-kontaminierten festen Abfällen, Verkokungsanlagen sowie Betrieben, die mit Holzschutzmitteln auf Kresolbasis arbeiten, ist ein Beweis für die langen Verweilzeiten dieser Verbindungen in der Umwelt.^[1, 5]

[*] Priv.-Doz. Dr. S. Fetzner

Fachbereich Biologie der Universität
Postfach 2503, D-26111 Oldenburg
Telefax.: Int. + 0441/798-3250

Dr. B. Tshisuaka, Prof. Dr. F. Lingens
Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim
D-70593 Stuttgart

Dr. R. Kappl, Prof. Dr. J. Hüttermann
Fachrichtung Biophysik der Universität des Saarlandes
D-66421 Homburg (Saar)

Die gegenüber ihren isocyclischen Analoga höhere biologische Aktivität vieler N-Heteroarene ist besonders besorgniserregend. Chinolin **10** ruft bei Ratten und Mäusen Leberkrebs hervor,^[6] und im Ames-Test erwiesen sich Chinolin **10** und einige seiner Derivate als indirekt mutagen.^[4, 7] N-Heterocyclische Amine, die aus gekochten Speisen isoliert wurden, Pyrolysate von Aminosäuren und Proteinen sowie erhitzte Mischungen aus Kreatin, Aminosäuren und Zuckern wirken auf Bakterien und Säugetiere mutagen und cancerogen.^[8] Auch über potentiell neurotoxische Effekte halogensubstituierter Oxychinoline wurde berichtet: In den 60er Jahren erreichte die subakute myelo-optische Neuropathie (SMON) in Japan epidemische Ausmaße. Als Ursache hierfür verdächtigte man die Oxychinolinderivate, die unter der Bezeichnung Entero-Vioform oder Mexaform häufig zur Behandlung von dyspeptischen Beschwerden verwendet wurden.^[9]

Chinolinderivate sind dennoch für einige medizinische Anwendungen unentbehrlich. Die therapeutischen Eigenschaften der Chininalkaloid-haltigen Chinarinde sind seit mehr als drei Jahrhunderten bekannt,^[10] und bis heute wird Malaria mit Chinin, Primaquin und Resochin behandelt. 8-Hydroxychinoline werden bei Haut- und Darminfektionen

verschrieben, fluorsubstituierte 4-Chinolone sind aufgrund ihrer bakteriziden Eigenschaften bei zahlreichen Gram-negativen und einigen Gram-positiven Pathogenen indiziert.^[11, 12] (Als Chinolone werden 1-substituierte 1,4-Dihydro-4-oxo-3-pyridincarbonsäuren bezeichnet, die in 5,6-Stellung einen weiteren anellierten Ring enthalten.) Die Entwicklung neuartiger Fluorchinolone erweiterte deren therapeutische Breite, so daß sie heute z. B. zur Behandlung von Lepra und anderen Mykobakteriosen,^[13] Typhus und Darminfektionen wie der therapieresistenten Shigellose^[14] verwendet werden. Neben ihrer Verwendung als Pharmazeutika werden Chinolinderivate als Rohstoffe und Lösungs-

mittel zur Herstellung von Agrochemikalien, Farben und Farbstoffen benötigt.^[15] Chinolingelb, das durch Kondensation von 2-Methylchinolin **1** und Phthalsäureanhydrid erhalten wird, ist der in Deutschland zugelassene Lebensmittelfarbstoff E 104. Die vielfältige Verwendung von N-Heteroarenen im täglichen Leben hat dazu geführt, daß immer mehr Menschen auf Chinolinderivate allergisch reagieren.^[16]

Zahlreiche Chinoline natürlichen Ursprungs kommen vor allem in höheren Pflanzen vor. 1987 waren die Strukturen von mehreren hundert Chinolinalkaloiden bekannt.^[10] Diese werden hauptsächlich von subtropischen Bäumen der Familien *Cinchona* und *Remija* gebildet, und Papaverin ist ein be-



S. Fetzner



B. Tshisuaka



F. Lingens



R. Kappl



J. Hüttermann

Susanne Fetzner, geboren 1963 in Calw, studierte 1982–1988 Biologie an der Universität Hohenheim. In ihrer von Prof. Dr. F. Lingens betreuten Doktorarbeit (1988–1990) beschäftigte sie sich mit dem bakteriellen Abbau halogensubstituierter aromatischer Kohlenwasserstoffe und mit einem Enzymsystem, das die Dehalogenierung katalysiert. Mit Arbeiten zum Thema „Mikrobielle Enzyme zur Hydroxylierung und zur Spaltung von Aromaten und Heterocyclen“ habilitierte sie sich 1996 an der Universität Hohenheim für das Fach Mikrobiologie. Seit 1996 vertritt sie die C4-Professur für Mikrobiologie an der Carl-von-Ossietzky-Universität Oldenburg. Ihre Forschungsschwerpunkte sind die Enzymologie und die Genetik kataboler Stoffwechselwege.

Barbara I. Tshisuaka, geboren 1951 in Rudolstadt, Thüringen, war zehn Jahre als MTA tätig, bevor sie 1984–1990 an der Universität Hohenheim Biologie studierte. Sie promovierte 1992 bei F. Lingens über die enzymatische Hydroxylierung von Chinolin. Als wissenschaftliche Mitarbeiterin von F. Lingens arbeitet sie über bakterielle molybdänhaltige Hydroxylasen und Pterin-Molybdän-Cofaktoren sowie enzymatische und genetische Aspekte des mikrobiellen Abbaus von Chinolin und seinen Derivaten. Seit einem Forschungsaufenthalt 1996 in Brasilien beschäftigt sie sich auch mit bakteriellen Endonukleasen.

Franz Lingens, geboren 1925, Promotion und Habilitation in Tübingen, ist seit 1967 an der Universität Hohenheim in Stuttgart tätig. Seine Arbeitsgebiete umfassen Aminosäuresynthesen mit Mannich-Basen, die unsymmetrische Dreikohlenstoffkondensation, die Amadori-Umlagerung, den anabolen und katabolen Stoffwechsel von Mikroorganismen, die Biosynthese von Aminosäuren, Riboflavin und Pyrrolnitrin, den Mechanismus der Mutagenese, die biologische Halogenierung und Dehalogenierung, den mikrobiellen Abbau von Arenen und Heterocyclen sowie die Eigenschaften und die Genetik von Mehrkomponenten-Enzymsystemen.

Reinhard Kappl, geboren 1956, studierte 1975–1982 Physik an der Universität Regensburg und der University of Colorado. Nach seinem Diplom promovierte er 1988 in Regensburg am Institut für Biophysik. Seit 1986 ist er Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Biophysik und Physikalische Grundlagen der Medizin der Universität des Saarlandes und des Klinikums Homburg/Saar.

Jürgen Hüttermann, geboren 1942, studierte 1961–1967 Physik an der Universität Karlsruhe, wo er 1969 promovierte. Nach seiner Habilitation an der Universität Regensburg 1972 war er dort als Wissenschaftlicher Rat und Professor tätig. Seit 1984 hat er eine C4-Professur für Biophysik an der Universität des Saarlandes inne.

kanntes Isochinolinalkaloid aus *Papaver somniferum*. Aber auch in Säugetieren und Insekten werden Chinolinderivate gebildet: Kynurensäure (1*H*-4-Oxochinolin-2-carbonsäure) wurde erstmals 1853 von Liebig aus Hundeharn isoliert, und Butenandt, Karlson und Zillig isolierten Kynurin (1*H*-4-Oxochinolin) aus den Puppen der Seidenraupe *Bombyx mori*.^[17] Sowohl Kynurensäure als auch Kynurin entstehen beim Abbau der aromatischen Aminosäure Tryptophan. Einige Bakterien aus der Gruppe der Pseudomonaden bilden in ihrem Sekundärstoffwechsel Pseudane (2-*n*-Alkyl-4-hydroxychinoline).^[10, 18]

Vermutlich ist es auf die natürliche Vielfalt von Chinolinen zurückzuführen, daß Bakterien im Laufe der Evolution Strategien entwickelten, mit denen sie diese Verbindungen metabolisieren.^[19] Mehrere Arbeitsgruppen isolierten aus Boden- und Wasserproben Bakterienstämme, die Chinolin **10** und seine Derivate als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen können. Die einfache Isolierung Chinolinabbauender Bakterien läßt erkennen, daß solche Organismen in der Natur weit verbreitet sind. Die Autoren dieses Aufsatzes haben sich eingehend mit dem Stoffwechsel von aeroben Bakterien befaßt, die auf Chinolinen wachsen: So wurden mutmaßliche Zwischenprodukte im Abbauweg isoliert und identifiziert und Enzyme, die wichtige Abbauschritte katalysieren, gereinigt und charakterisiert. Dabei wurde ein neuer Typ ringspaltender Enzyme entdeckt. Es handelt sich um Dioxygenasen, die den Heterocyclus auf ziemlich ungewöhnliche Art aufbrechen: Sie katalysieren die Spaltung zweier C-C-Bindungen unter Freisetzung von Kohlenmonoxid. Eine andere wichtige am Abbau beteiligte Enzymfamilie sind die molybdänhaltigen Hydroxylasen, die in ihren aktiven Zentren unterschiedliche Formen eines Pterin-Molybdän-Cofaktors enthalten.

Für Wissenschaftler ist vor allem die Funktionsweise dieser von allen lebenden Organismen synthetisierten Enzymproteine faszinierend. In der Praxis könnten solche Biokatalysatoren besonders in der Technischen Chemie Verwendung finden, da Hydroxylierungen wichtige Schritte bei chemischen Synthesen zur Herstellung von Agrochemikalien und Pharmazeutika sind. Biokatalysatoren wie die molybdänhaltigen Hydroxylasen ermöglichen substrat- und regiospezifische Hydroxylierungen ohne Nebenprodukte. Sie können unter Umständen schwierige und/oder teure konventionelle Synthesen ersetzen, so daß es sich in naher Zukunft lohnen könnte, hydroxylierte Zwischenprodukte für weiterführende Synthesen mit Bakterien oder isolierten bakteriellen Enzymsystemen herzustellen.

2. Aerober bakterieller Abbau von Chinolin und Chinolinderivaten

2.1. Grundzüge der Verwertung von Chinolin und Chinolinderivaten durch Bakterien

Unsere Untersuchungen des bakteriellen Abbaus von Chinolin **10** begannen mit der Isolierung von 16 Bakterienstämmen aus Erd- und Wasserproben sowie aus dem Belebtschlamm einer Kläranlage. Diese Bakterien konnten mit **10**

als einziger Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle wachsen.^[20] Detailliertere Untersuchungen wurden an zwei Gram-negativen Pseudomonadenstämmen und am Gram-positiven *Rhodococcus*-Stamm B1 durchgeführt. Anhand der während des Abbaus im Nährmedium auftretenden Zwischenprodukte wurden zwei Abbauewege für Chinolin **10** vorgeschlagen^[21] (Abschnitte 2.3 und 2.5): Bei beiden wird im ersten Schritt **10** zu 1*H*-2-Oxochinolin **12** umgesetzt. In der Regel beginnt der bakterielle Abbau von Chinolinderivaten mit einer Hydroxylierung in 2- oder in 4-Stellung zum N-Atom. Untersuchungen an gereinigten hydroxylierenden Enzymen mit ¹⁸O-markiertem Wasser ergaben, daß das ins Produkt eingebaute Sauerstoffatom in fast allen Fällen aus dem Wassermolekül und nicht aus molekularem Sauerstoff stammt.

Während ihres Wachstums auf Chinolin **10** oder einem Derivat von **10** setzten viele Bakterienstämme das jeweilige Substrat nahezu quantitativ in eine 1*H*-2-Oxo- oder 1*H*-4-Oxo-Verbindung um. Diese wurde vor dem weiteren Abbau zunächst im Kulturmedium akkumuliert. Als Beispiel ist in Abbildung 1 die Akkumulation von Kynurensäure (1*H*-4-

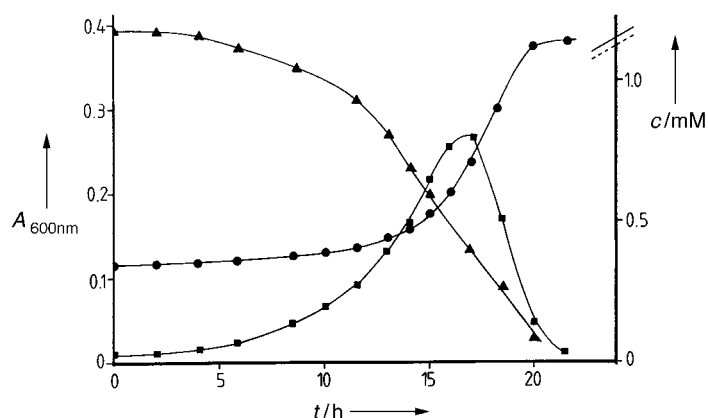


Abb. 1. Wachstum von *Serratia marcescens* 2CC-1 auf Chinaldinsäure. ●: Die Absorption (Trübung) bei 600 nm ($A_{600\text{nm}}$) zeigt das Wachstum an; ▲: $c(\text{Chinaldinsäure})$; ■: $c(\text{Kynurensäure})$.

Oxochinolin-2-carbonsäure) während des Wachstums eines *Serratia*-Stammes auf Chinaldinsäure (Chinolin-2-carbonsäure) dargestellt. Eine solche enorme Anhäufung eines Metaboliten ist ungewöhnlich. Das im Abbauweg nachfolgende Enzym scheint wegen seiner geringen katalytischen Aktivität einen Engpaß zu verursachen. Möglich wäre auch ein differentieller Regulierungsmechanismus wie die sequentielle Induzierbarkeit von Gruppen katabolischer Gene. Dabei wird jede Gruppe durch einen spezifischen Effektor (Substrat) reguliert, der erst bei Erreichen einer bestimmten Schwellenkonzentration die Genexpression aktiviert. Der Grund für die Anhäufung der 1*H*-2-Oxo- und 1*H*-4-Oxo-Verbindungen ist bisher nicht bekannt. Die rasche Hydroxylierung zu Beginn des Abbaus könnte jedoch eine lebenswichtige Funktion haben, z.B. die sofortige Entgiftung des Chinolin(derivat)s, denn die Oxoverbindungen sind für Bakterien wesentlich weniger toxisch als die nichthydroxylierten Substrate.

Selbstverständlich ist die vorübergehende Ausscheidung eines katabolischen Zwischenprodukts in die Kulturbrühe

sehr hilfreich, wenn die Reaktionen des Abbauwegs ermittelt werden sollen. Vermutete Zwischenprodukte können aber auch erhalten werden, indem man Mutanten herstellt und selektiert, bei denen ein bestimmter katalytischer Schritt der Reaktionsfolge blockiert ist. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von Antimetaboliten, die als „strukturelle Doppelgänger“ natürlicher Metabolite bestimmte Stoffwechselvorgänge inhibieren. Beide Methoden können zwar zur Akkumulation des jeweiligen Metaboliten vor der Blockade führen, doch kann unter Umständen auch ein spontanes Umsetzungs- oder Zersetzungsprodukt des echten Zwischenprodukts akkumulieren. Im Unterschied zu diesen Sekundärprodukten sollten die echten Stoffwechselzwischenprodukte das Wachstum fördern, wenn die Bakterien damit gefüttert werden. Allerdings wird auch das echte Zwischenprodukt nicht „verspeist“, wenn es die Zellmembran der Bakterienzelle nicht passieren kann.

Dennoch kann die Reinherstellung des vermuteten Stoffwechselzwischenprodukts und seine Strukturaufklärung durch Absorptionsspektroskopie, Massenspektrometrie sowie ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie zur Aufstellung einer hypothetischen Reaktionsfolge führen. Zur Zeit sind bei aeroben Bakterien vier Chinolin-Abbauege bekannt, die im folgenden diskutiert werden: 1. der Anthranilsäure-, 2. der 5,6-Dihydroxy-1*H*-2-oxochinolin-, 3. der 7,8-Dihydroxy-1*H*-2-oxochinolin- und 4. der 8-Hydroxycumarin-Abbauege.

2.2. Der Anthranilsäure-Abbauege

Der Abbau von Chinaldin (2-Methylchinolin) **1** beginnt bei *Arthrobacter* sp. Rü61a mit einer Hydroxylierung an C4, an die sich eine Monooxygenierung an C3 des Produkts **2** anschließt (Schema 1a). Bei der recht ungewöhnlichen 2,4-dioxygenolytischen Ringspaltung (siehe Abschnitt 3) von 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin **3** entstehen Kohlenmonoxid und *N*-Acetylanthranilsäure **4**. Deren Hydrolyseprodukt, Anthranilsäure **5**, wird weiter zu Brenzcatechin **6** und über den bekannten 2-Oxo adipinsäure-Weg zu Zwischenprodukten des Krebs-Cyclus abgebaut.^[22] Analog verläuft der Abbau von 1*H*-4-Oxochinolin **7** bei *Pseudomonas putida* 33/1 über die oxygenierten Zwischenstufen **8** und **9**.^[23] Beim Anthranilsäure-Abbauege wird demnach der *N*-Heterocyclus vor dem Benzolring gespalten.

2.3. Der 5,6-Dihydroxy-1*H*-2-oxochinolin-Abbauege

Comamonas testosteroni 63 baut 3-Methylchinolin **11** über 5,6-Dihydroxy-1*H*-3-methyl-2-oxochinolin **19** ab (Schema 1b). Wir nehmen an, daß bei dieser Verbindung der Benzolring gespalten wird, denn es gelang, das *N*-heterocyclische Zwischenprodukt 3-Methyl-2,5,6-trihydroxypyridin **21** zu isolieren.^[24] Vermutlich ist auch 5,6-Dihydroxy-1*H*-2-oxochinolin **18** ein Metabolit von Chinolin **10** bei *Comamonas testosteroni* 63,^[25] *Pseudomonas putida* K1,^[26] *Rhodococcus* sp. B1,^[21] *Moraxella* sp.^[27] und eventuell bei *Nocardia* sp.^[28] Aromatische *ortho*-Dihydroxyderivate wie **18** oder

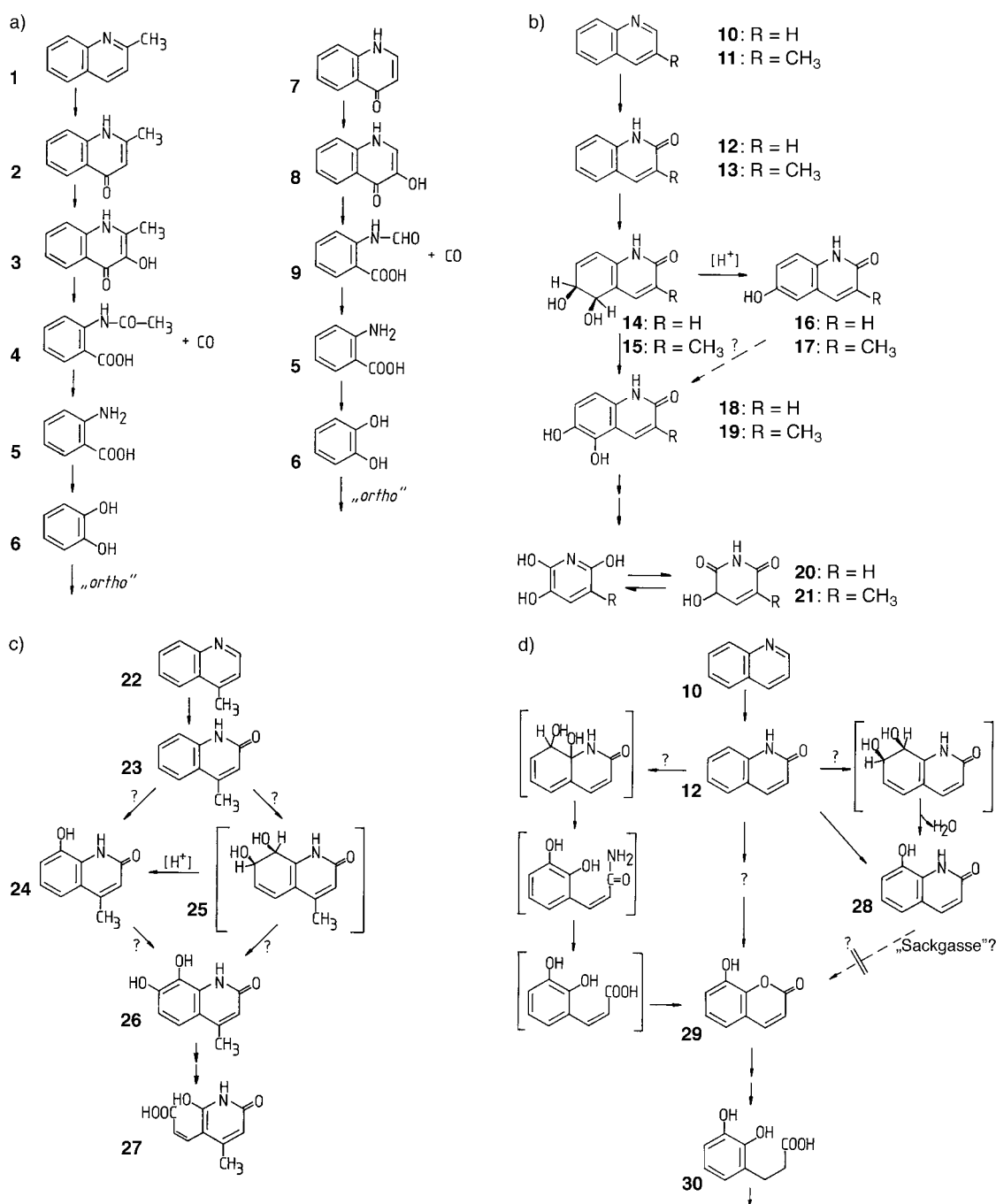
19 könnten entweder durch Dioxygenase-katalysierte Bildung eines Dihydrodiols mit nachfolgender Dehydrogenase-Reaktion oder durch zwei Monooxygenase-katalysierte Schritte entstehen. Bei der Umsetzung der 1*H*-2-Oxochinoline **12** und **13** durch *Comamonas testosteroni* 63 wurde nachgewiesen, daß eine 5,6-Dioxygenase die Bildung der entsprechenden 5,6-Dihydrodirole **14** bzw. **15** katalysiert.^[25]

2.4. Der 7,8-Dihydroxy-1*H*-2-oxochinolin-Abbauege

Ähnlich dem in Abschnitt 2.3 beschriebenen Abbauege verläuft auch der 7,8-Dihydroxy-1*H*-2-oxochinolin-Weg über ein *ortho*-Dihydroxybenzol-Derivat, bei dem wahrscheinlich der Benzolring gespalten wird. 7,8-Dihydroxy-1*H*-2-oxochinoline sind Schlüsselverbindungen, die beim Abbau von 4-Methylchinolin **22** durch *Pseudomonas putida* K1^[26] (Schema 1c), von 4-Hydroxychinolin durch ein Bodenbakterium der Gruppe *Pseudomonas*^[29] und beim Abbau von Kynurensäure^[30, 31] entstehen. Das 8-Monohydroxyderivat **24** von 1*H*-4-Methyl-2-oxochinolin **23** wurde zwar als Metabolit in sauren Extrakten der Kulturbrühe von *Pseudomonas putida* K1 entdeckt,^[26] das 4-Methylchinolin **22** abbauen kann, doch muß **24** kein echtes Zwischenprodukt sein. Es könnte auch durch Dehydratisierung des hypothetischen *cis*-7,8-Dihydrodiols **25** entstehen und somit das Produkt einer „Sackgassen-Reaktion“ sein. Die vermutlich an diesem Abbauege beteiligten 7,8-Dioxygenasen sind bisher noch nicht untersucht worden, das postulierte *cis*-7,8-Dihydrodiol wurde aber als Metabolit des Abbaus von Kynurensäure durch *Pseudomonas fluorescens* nachgewiesen.^[30]

2.5. Der 8-Hydroxycumarin-Abbauege

Während bei den in den Schema 1b, c skizzierten Abbauegen der Benzolring vor dem Pyridinring gespalten wird, gibt es für Chinolin **10** noch einen besonderen Abbauege, bei dem unter Bildung von 8-Hydroxycumarin **29** bevorzugt der *N*-Heterocyclus gespalten wird (Schema 1d). Dieser zuerst von Shukla beschriebene Chinolin-Abbauege^[32] wurde auch von unserer Arbeitsgruppe bei zwei *Pseudomonas*-Stämmen entdeckt. Die Reaktionsfolge des Chinolinabbaus ist aber noch immer unklar: Nur wenige Metabolite wurden als echte Zwischenprodukte identifiziert, und der Mechanismus für die Spaltung des *N*-heterocyclischen Rings ist unbekannt. Bei *Pseudomonas putida* 86,^[21] *Pseudomonas fluorescens* 3,^[21] *Pseudomonas pseudoalcaligenes* und *Pseudomonas stutzeri*^[32] wurden 1*H*-2-Oxochinolin **12**, 1*H*-8-Hydroxy-2-oxochinolin **28**, 8-Hydroxycumarin **29** und 3-(2,3-Dihydroxyphenyl)propionsäure **30** als Metaboliten gefunden. Die Verbindungen **29** und **30** scheinen echte Zwischenprodukte des Abbaus zu sein, die Bildung von **30** aus **29** oder aus einem anderen hypothetischen Zwischenprodukt bleibt aber rätselhaft. Die Enzyme, die den ersten und zweiten Schritt dieses Abbauwegs katalysieren, wurden hingegen eingehend analysiert. So ist die Chinolin-2-Oxidoreduktase aus *Pseudomonas putida* 86, die

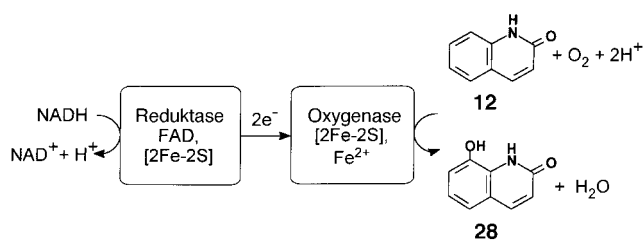


Schema 1. Aerobe bakterielle Abbaupfade von Chinolin und Chinolinderivaten. a) Anthranilsäure-Abbaupfad: Abbau von Chinaldin **1** durch *Arthrobacter* sp. Rü 61 a^[22] und Abbau von 1H-4-Oxochinolin **7** durch *Pseudomonas putida* 33/1.^[23] b) 5,6-Dihydroxy-1H-2-oxochinolin-Abbaupfad: Abbau von Chinolin **10** und 3-Methylchinolin **11** durch *Comamonas testosteroni* 63.^[24] c) 7,8-Dihydroxy-1H-2-oxochinolin-Abbaupfad: Abbau von 4-Methylchinolin **22** durch *Pseudomonas putida* K1.^[26] d) 8-Hydroxycoumarin-Abbaupfad: Abbau von Chinolin **10** durch *Pseudomonas putida* 86,^[21] *Pseudomonas fluorescens* 3,^[21] *Pseudomonas stutzeri* und *Pseudomonas pseudoalcaligenes*.^[32]

die Bildung von 1H-2-Oxochinolin **12** katalysiert, gründlich untersucht worden (Abschnitt 4.2).

Die 1H-2-Oxochinolin-8-Monooxygenase, die im nächsten Schritt die Bildung von 1H-8-Hydroxy-2-oxochinolin **28** katalysiert, besteht aus zwei induzierbaren Proteinkomponenten, einer „Reduktase“- und einer „Oxygenase“-Komponente, die eine kurze Elektronentransportkette bilden (Schema 2). Sie verläuft vom exogenen Elektronendonator NADH über die Redoxzentren der Reduktase-Kom-

ponente (FAD und [2Fe-2S]-Ferredoxin) und die Redoxzentren der Oxygenase (Rieske-Typ-[2Fe-2S]-Cluster) schließlich zum postulierten einkernigen Fe²⁺-Zentrum der Oxygenase-Komponente. Dieses soll molekularen Sauerstoff aktivieren und wäre damit der Ort, an dem die Oxygenierung des Substrats stattfindet.^[33] Die weiteren Schritte des Abbaupfades (Schema 1 d) bleiben spekulativ, da die zugehörigen Enzyme bisher noch nicht angereichert wurden.



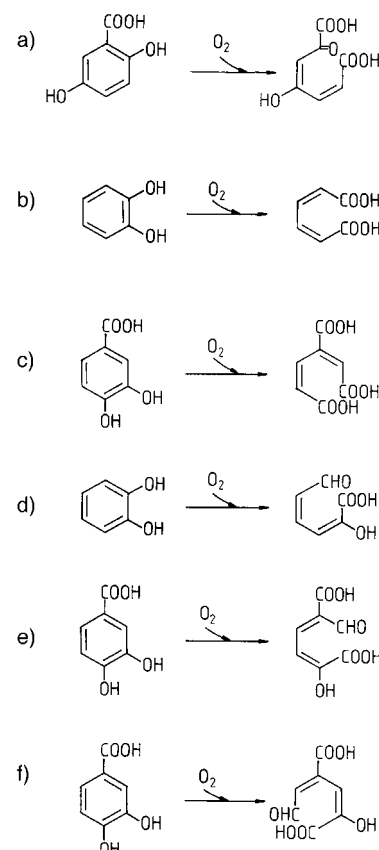
Schema 2. 1H-2-Oxochinolin-8-Monooxygenase, ein Zwei-Komponenten-system aus *Pseudomonas putida* 86, katalysiert die Hydroxylierung von **12**.^[33]

Trotz unseres Wissens über eine Reihe von Abbauwegen ist es derzeit nicht möglich, vorherzusagen, auf welchem Weg ein Bakterienstamm ein bestimmtes Chinolinderivat abbaut. Bei *Comonomas testosteroni* 63 werden Chinolin **10** und 3-Methylchinolin **11** auf die gleiche Weise (Abschnitt 2.3) und vermutlich auch vom gleichen Satz kataboler Enzyme abgebaut.^[25] *Pseudomonas* sp. K1 hingegen verwertet 4-Methylchinolin **22** über den 7,8-Dihydroxy-1H-2-oxochinolin-Weg, Chinolin **10** aber über den 5,6-Dihydroxy-1H-2-oxochinolin-Weg. Das ist ein Hinweis darauf, daß bei diesem Stamm jedes Substrat die Expression eines anderen Satzes kataboler Enzyme induziert.^[26] Unsubstituiertes Chinolin **10** ist je nach Bakterienstamm prinzipiell auf drei Wegen abbaubar (siehe Abschnitte 2.3–2.5).

Vorschläge für Abbauewege, die sich zunächst vor allem auf die Isolierung und Charakterisierung von Metaboliten stützen, sollten lediglich als Arbeitshypothesen angesehen werden, die noch durch den Nachweis und die Charakterisierung der Enzyme, die die einzelnen Schritte katalysieren, erhärtet werden müssen. Um die vermuteten Umsetzungen zu bestätigen und einen tieferen Einblick in die Mechanismen enzymkatalysierter Reaktionen zu erhalten, konzentrierten sich unsere Untersuchungen auf die Charakterisierung einiger kataboler Enzyme. Die Strukturen und die katalytischen Eigenschaften der Enzymproteine und in einigen Fällen auch die Nucleotidsequenz der für die Abbauenzyme kodierenden Gene wurden bestimmt und verglichen.

3. Dioxygenasen katalysieren die Ringöffnung beim bakteriellen Abbau von Heterocyclen

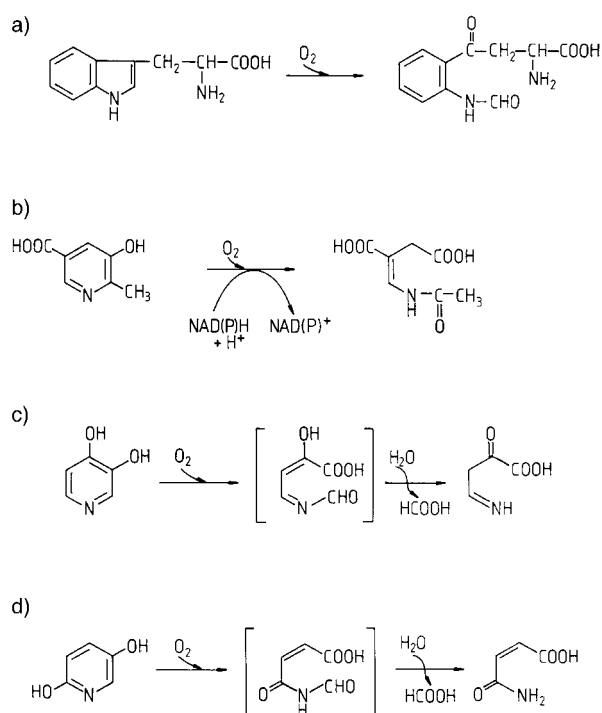
Die Ringöffnung ist der entscheidende Schritt beim mikrobiellen Abbau von Arenen und Heterocyclen. Beim aeroben bakteriellen Abbau von Benzolderivaten werden im allgemeinen zwei Hydroxygruppen eingeführt, die entweder in *ortho*- oder in *para*-Stellung zueinander stehen. Bei der Spaltung durch eine Dioxygenase entstehen aliphatische Verbindungen als Zwischenprodukte (Schema 3). Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase und die „Intradiol“- und „Extradiol“-Enzyme, die die *ortho*- bzw. *meta*-Spaltung von Brenzcatechin-ähnlichen Verbindungen katalysieren, sind gut charakterisierte Nicht-Häm-Eisen-Dioxygenasen.^[34, 35] Dagegen ist über die meisten Enzyme, die die Spaltung von Heterocyclen katalysieren, nur wenig bekannt. An Spaltungen von Heterocyclen sind sehr verschiedene Enzymtypen beteiligt: Die L-Tryptophan-2,3-Dioxygenasen (Schema 4a) einiger Bakterien-



Schema 3. Dioxygenase-katalysierte Spaltungen von Arenen. b), c): „*ortho*“-Spaltungen; d)–f): „*meta*“-Spaltungen. Katalyse durch a) Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase, b) Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase, c) Protocatechusäure-3,4-Dioxygenase, d) Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase, e) Protocatechusäure-2,3-Dioxygenase, f) Protocatechusäure-4,5-Dioxygenase.

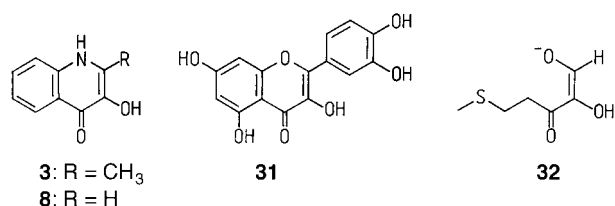
stämme sind Häm-haltige Enzyme,^[34] 2-Methyl-3-hydroxypyridin-5-carbonsäure-Oxygenase (Schema 4b) ist eine NAD(P)H-abhängige, FAD-haltige Dioxygenase.^[36] Die 3,4-Dihydroxypyridin-Dioxygenase aus *Agrobacterium* sp. katalysiert vermutlich eine *meta*-Spaltung, bei der 3-(N-Formyl)-formiminobrenztraubensäure entsteht, deren Hydrolyse die nachgewiesenen Produkte Ameisensäure und 3-Formiminobrenztraubensäure liefern würde (Schema 4c).^[37] Maleinsäuremonoimid und Ameisensäure wurden als Hydrolyseprodukte bei einer analogen Reaktion identifiziert, die von 2,5-Dihydroxypyridin-Dioxygenasen mehrerer Stämme katalysiert wird (Schema 4d).^[38] Diese Enzyme, die für ihre Aktivität neben Fe²⁺ einen Thiolgruppen-Donor wie Dithiothreitol, Cystein oder Glutathion benötigen, konnten wegen ihrer Instabilität allerdings nicht eingehend charakterisiert werden.

Im Anthranilsäure-Weg entdeckten wir beim Abbau von Chinaldin **1** und 1H-4-Oxochinolin **7** eine ungewöhnliche Ringöffnung des N-Heterocyclus: Zwei C-C-Bindungen werden unter Freisetzung von Kohlenmonoxid gespalten (Schema 1a). Kohlenmonoxid-bildende Enzyme sind selten. Schon seit einiger Zeit ist das mikrosomale Häm-Monooxygenase-System aus Säugern bekannt, das aus Eisen-Protoporphyrin IX in Gegenwart von NADPH und molekularem Sauerstoff Kohlenmonoxid und Biliverdin IX α bildet.^[39] Es gibt aber auch zwei Enzyme, die wie die prokaryotischen 2,4-Dioxygenasen des Anthranilsäure-Wegs die oxidative Spaltung



Schema 4. Reaktionen, die durch N-Heterocyclus spaltende Dioxygenasen katalysiert werden. Katalyse durch a) Tryptophan-2,3-Dioxygenase, b) 2-Methyl-3-hydroxypyridin-5-carbonsäure-Oxygenase, c) 3,4-Dihydroxypyridin-Dioxygenase, d) 2,5-Dihydroxypyridin-Dioxygenase.

zweier C-C-Bindungen unter Freisetzung von CO katalysieren: die eukaryotische Flavonol-2,4-Dioxygenase aus *Aspergillus flavus*^[40, 41] und die prokaryotische Aci-reduktion-Oxidase (CO-bildend) aus *Klebsiella pneumoniae*.^[42, 43] Diese ist am Biosyntheseweg der Methionin-Rückgewinnung beteiligt und katalysiert die 1,3-Dioxygenolyse des 1,2-Dihydroxy-3-oxo-5-methylsulfanylpenten-Anions **32** zu S-Methylthiopropionsäure, CO und Ameisensäure. Die Substrate dieser Dioxygenasen weisen strukturelle Gemeinsamkeiten auf: Alle haben eine Doppelbindung zwischen C2 und C3 (C1 und C2), eine Hydroxygruppe an C3 (C2) sowie eine Carbonylgruppe an C4 (C3) (Schema 5).



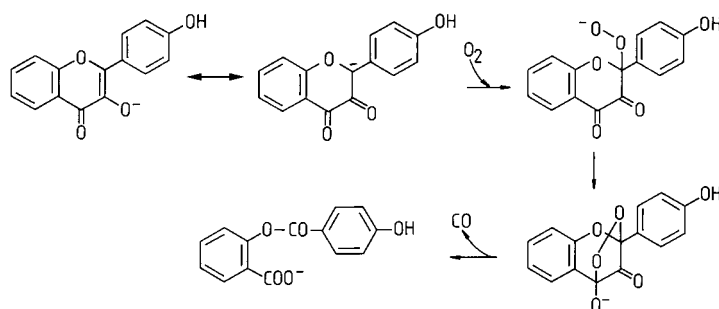
Schema 5. Organische Substrate von Dioxygenasen, die die Spaltung von zwei C-C-Bindungen unter Freisetzung von CO katalysieren. **3** und **8**: Substrate der 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin-2,4-Dioxygenase bzw. der 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin-2,4-Dioxygenase.^[44, 45] **31**: Substrat der Flavonol-2,4-Dioxygenase.^[40, 41] **32**: Substrat der Aci-reduktion-Oxidase.^[42, 43]

Die bakteriellen CO-bildenden Dioxygenasen, die beim Abbau von Chinaldin **1** und 1H-4-Oxochinaldin **7** die Spaltung des Heterocyclus katalysieren, sind kleine, monomere Proteine, die ihr Substrat in Gegenwart von O₂ spalten, ohne zusätzlich ein Cosubstrat oder ein Metallion zu benötigen.

Versuche, die in einer Atmosphäre aus isotonenmarkiertem Sauerstoff (je 50 % ¹⁸O₂ und ¹⁶O₂) durchgeführt wurden, ergaben, daß in die C2- und C4-Position des Substrats stets zwei Sauerstoffatome eingebaut wurden, die beide entweder aus ¹⁸O₂ oder aus ¹⁶O₂ stammten. Somit ist bewiesen, daß es sich bei diesen ungewöhnlichen Enzymen tatsächlich um 2,4-Dioxygenasen handelt.^[44, 45]

Die Flavonol-2,4-Dioxygenase (Quercetinase) katalysiert die analoge 2,4-dioxygenolytische CO-Freisetzung aus dem O-heterocyclischen Flavonol Quercetin **31**. Das Enzym soll pro Molekül zwei Cu^{II}-Atome enthalten.^[40] Stabile Cu^{II}-Komplexe von Flavonolen, die vermutlich durch Koordination der 3-Hydroxy- und 4-Carbonylgruppe an das Cu-Ion gebildet werden, sind bekannt. Die durch Cu^{II}-Flavonolat katalysierte Oxygenierung von Flavonolen führt in guter Ausbeute ausschließlich zu den Produkten der Quercetinase-Reaktion und wird daher als Modellreaktion für die enzymatisch katalysierte Umsetzung angesehen. Bei dieser Reaktion soll der einkernige Cu^{II}-Cofaktor das Substrat Flavonol für den Angriff von molekularem Sauerstoff durch Bildung eines Cu^{II}-Komplexes aktivieren.^[46]

Auch die basenkatalysierte Autoxidation der Flavonole ist ein nichtenzymatisches Modell für die Reaktion der Flavonol-2,4-Dioxygenase: 3-Hydroxyflavone unterliegen der basenkatalysierten Oxygenolyse, wenn ihre 3-Hydroxygruppe deprotoniert vorliegt und ihre Carbonylfunktion an C4 fixiert ist. Dabei entstehen die entsprechenden Depside (phenolische Carbonsäureester) und Kohlenmonoxid in sehr guter Ausbeute.^[47] O₂ scheint in die deprotonierte Form des Flavonols eingebaut zu werden, wobei ein Peroxy-Zwischenprodukt entsteht, aus dem nach intramolekularem nucleophilem Angriff ein Endoperoxid gebildet wird (Schema 6).

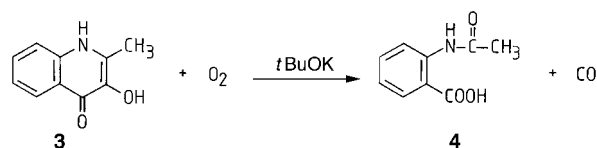


Schema 6. Vorgeschlagener Mechanismus der basenkatalysierten, dioxygenolytischen Spaltung des Anions von Quercetin **31**, bei der CO freigesetzt wird.^[47]

Eine entsprechende Depsidbildung findet auch mit dem Katalysator [Co^{II}(salen)] statt (salen = N,N'-Bis(salicyliden)-ethylen).^[48] Katalytisch aktive Cobalt-Sauerstoff-Komplexe wirken eher wie eine Base und nicht wie ein Oxidationsmittel. Auf der Grundlage von basenkatalysierten Modellreaktionen wurde für die Flavonol-2,4-Dioxygenase-Reaktion ein direkter ionischer Mechanismus vorgeschlagen.^[47, 48]

Die basenkatalysierte chemische Dioxygenierung ermöglichte die Aufstellung eines ähnlichen, nichtenzymatischen Modells für die Reaktion der 2,4-Dioxygenasen, die N-Heterocyclus spalten: 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin **3** und

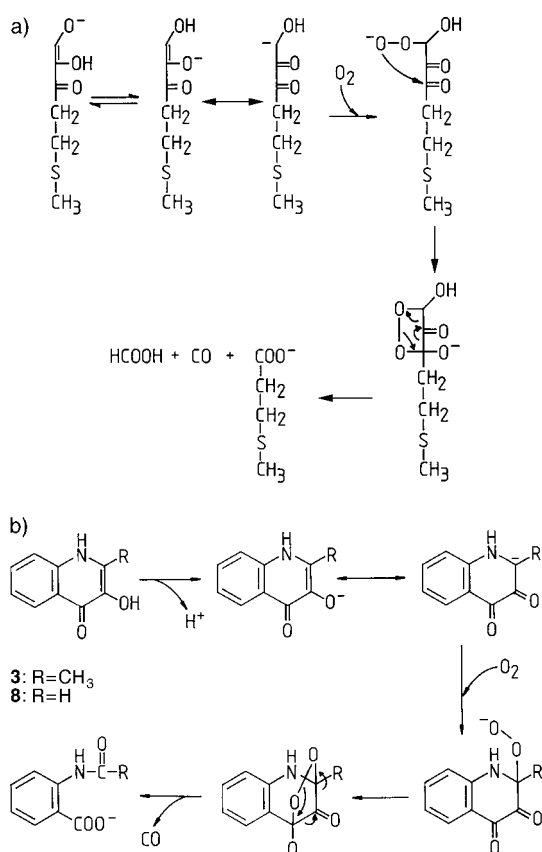
1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin **8** reagieren im aprotischen Lösungsmittel *N,N*-Dimethylformamid in Gegenwart von Kalium-*tert*-butoxid mit molekularem Sauerstoff. Dabei werden aus **3** Kohlenmonoxid, *N*-Acetylanthranilsäure **4** und Anthranilsäure **5** (durch Hydrolyse von **4**) gebildet (Schema 7).



Schema 7. Basenkatalysierte Dioxygenolyse von 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin **3**.^[45]

Entsprechend wurde nach der basenkatalysierten, dioxygenolytischen Decarbonylierung von **8** als Hydrolyseprodukt Anthranilsäure **5** identifiziert. Unter anaeroben Bedingungen konnten sowohl **3** als auch **8** nach Neutralisieren der Proben unverändert und vollständig wiedergewonnen werden. Unter Basenkatalyse wird demnach die enzymkatalysierte 2,4-dioxygenolytische Decarbonylierung der *N*-heterocyclischen Verbindungen **3** und **8** nachgeahmt.^[45] Im Unterschied zu Quercetinase, bei der Cu^{II} als Base wirken könnte, enthält die 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin- und die 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin-Dioxygenase weder ein Metallion noch einen anderen Cofaktor. Allerdings könnte die funktionelle Gruppe eines Aminosäurerestes eine Basenkatalyse bewirken. Die Aminosäurereste, die im katalytischen Zentrum die *N*-heterocyclischen Substrate für den Angriff des molekularen Sauerstoffs aktivieren, sind aber noch nicht identifiziert worden.^[45]

Kürzlich wurde über die Eigenschaften des 1,3-Dioxygenolyse-Enzyms Aci-reduktion-Oxidase aus *Klebsiella pneumoniae* berichtet.^[43] Ebenso wie die 2,4-Dioxygenasen des Anthranilsäure-Abbauweges von Chinaldin **1** und 1*H*-4-Oxochinolin **7** scheint auch dieses Enzym weder einen Chromophor noch ein Metallion als Cofaktor zu enthalten. Die Autoren schlagen hier einen dem Mechanismus der Quercetinase ähnlichen Reaktionsmechanismus vor, der mit der Bildung eines Substratanions und der Anlagerung von O₂ an C1 des tautomeren Carbanions beginnt. Die dabei entstandene Peroxygruppe könnte dann nucleophil an der C3-Carbonylgruppe angreifen unter Bildung eines Endoperoxids als labiles Zwischenprodukt (Schema 8a). Noch ist nicht bekannt, ob bei dem Dioxygenase-katalysierten Sauerstoffeinbau in das Substratanion Radikalanionen als Zwischenprodukte entstehen, wie für die Oxygenierung anderer Carbanionen beschrieben wurde.^[49] Wray und Abeles^[43] schlugen für die Bildung des Peroxyanions einen schrittweisen Einelektronenübergang vom Carbanion zu molekularem Sauerstoff vor. Nach Nishinaga et al.^[47, 50] könnte bei basenkatalysierten Oxygenierungen für die Reaktion des Carbanions mit molekularem Sauerstoff auch ein direkter ionischer Mechanismus ohne eine Kettenreaktion mit freien Radikalen in Frage kommen. In Schema 8b sind die hypothetischen Mechanismen der 2,4-dioxygenolytischen CO-Bildung aus **3** und **8** zusammengefasst. Zur Aufklärung des Mechanismus der Dioxygenase-katalysierten oxidativen Spaltung zweier C-C-Bindungen unter Freisetzung von CO sind noch weitere Untersuchungen nötig.



Schema 8. Vorgeschlagene Mechanismen der Dioxygenase-katalysierten CO-Bildung a) für die Aci-reduktion-Oxidase aus *Klebsiella pneumoniae*,^[43] b) für die 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin-2,4-Dioxygenase aus *Pseudomonas putida* (R = H) und die 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin-2,4-Dioxygenase aus *Arthrobacter* sp. Rü61a (R = CH₃).^[45]

4. Molybdänhaltige Enzyme

4.1. Die Pterin-Molybdän-Cofaktoren

Im allgemeinen bestimmte die Anwesenheit von Molybdatspuren im Kulturmedium, ob Bakterien Chinolin **10** oder dessen Derivate nutzen konnten oder nicht. Das Wachstum der Bakterienstämme auf dem jeweils ersten Zwischenprodukt des entsprechenden Abbauweges, d. h. auf den 1*H*-2-Oxo- oder 1*H*-4-Oxo-chinolinderivaten (Schema 1a–d), wurde dagegen durch Molybdat nicht beeinflusst. Dies war ein Hinweis auf die Rolle, die dem Spurenelement Molybdän bei der ersten Hydroxylierung an C2 oder C4 der Chinolinderivate möglicherweise zukommt. Molybdän ist essentiell an den biogeochemischen Stickstoff-, Schwefel- und Kohlenstoffzyklen beteiligt. In Enzymen kommt Molybdän als Teil redoxaktiver Cofaktoren vor. Eingehend untersucht sind die molybdänhaltigen Nitrogenasen, die ausschließlich von Prokaryoten synthetisiert werden. Das „MoFe-Protein“ der Nitrogenase enthält den Eisen-Molybdän-Cofaktor (FeMoCo), in dem Molybdän Bestandteil eines ungewöhnlichen Eisen-Molybdän-Schwefel-Clusters ist.^[51] Am FeMoCo wird atmosphärischer Stickstoff zu Ammoniak reduziert – das „Haber-Bosch-Verfahren“ der Natur.

Mit Ausnahme der Nitrogenase enthalten alle anderen bisher beschriebenen Molybdoenzyme einen Pterin-Molyb-

dän-Cofaktor. Bei allen durch Enzyme mit diesem Cofaktor katalysierten Reaktionen wird ein Sauerstoffatom in einer Zwei-Elektronen-Redoxreaktion auf das Substrat übertragen oder vom Substrat abstrahiert. Zu dieser großen Enzymfamilie gehören z.B. Nitrat-Reduktase, Sulfid-Oxidase, Ameisensäure-Dehydrogenase, Kohlenmonoxid-Oxidoreduktase, Arsenit-Oxidase sowie molybdänhaltige Hydroxylasen pro- und eukaryotischer Herkunft wie Aldehyd-Oxidoreduktasen, Purin-Hydroxylase und Xanthin-Dehydrogenase/Oxidase.^[52–55] Viele bakterielle Enzyme, die Hydroxylierungen an Pyridincarbonsäuren, Chinolinderivaten und anderen Heterocyclen katalysieren (Abschnitt 4.2), sind ebenfalls molybdänhaltige Hydroxylasen.

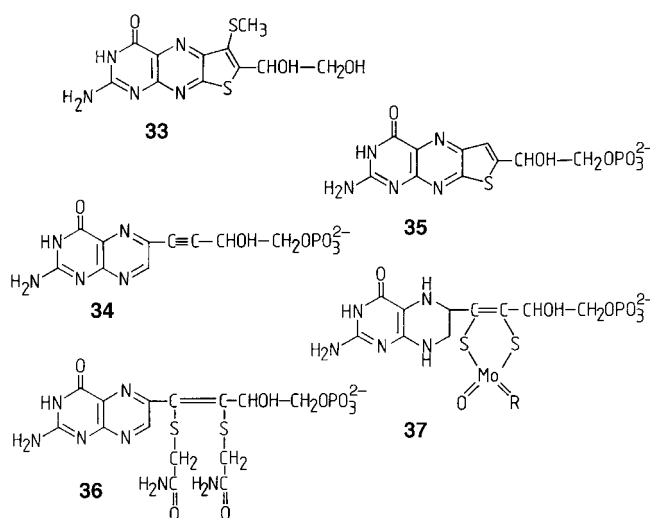
Hydroxylierungen sind im Metabolismus aller lebenden Organismen weit verbreitet. Die meisten hydroxylierenden Enzyme wie Mono- und Dioxygenasen führen ein Sauerstoffatom aus dem Luftsauerstoff in das Substrat ein. Bei diesen Reaktionen werden Reduktionsäquivalente verbraucht. Dagegen verwenden molybdänhaltige Enzyme Wasser als Sauerstoffquelle. Hierbei werden Reduktionsäquivalente gebildet, wie aus Gleichung (1) hervorgeht. Der Pterin-Molybdän-



Cofaktor der Hydroxylasen enthält Molybdän komplex gebunden als Molybdopterin oder Molybdopterin-Dinucleotid. Im Unterschied zu anderen organischen Cofaktoren sind die von ihrem Protein getrennten Pterin-Cofaktoren instabil. Daher waren klassische Versuche wie die Rekonstitution der Enzymaktivität nach Zugabe des isolierten Cofaktors zum Protein nicht möglich. Die Strukturaufklärung der Molybdän-Cofaktoren wurde vor allem dadurch erschwert, daß diese Cofaktoren sofort nach der Abtrennung vom Enzymprotein in zahlreiche fluoreszierende Oxidationsprodukte zerfallen.

1940 isolierte Koschara aus 1000 L(!) menschlichen Urins äußerst geringe Mengen einer schwefelhaltigen Verbindung, die er Urothion nannte.^[56] Damals konnte er nicht ahnen, daß er das Stoffwechselprodukt des Pterin-Molybdän-Cofaktors entdeckt hatte. Nahezu dreißig Jahre später wiederholten Goto et al. die mühevollen Prozedur.^[57] Ihnen gelang die Strukturbestimmung von Urothion **33**, seine Herkunft blieb allerdings weiterhin rätselhaft. Erst 1982 erkannten Johnson und Rajagopalan den Zusammenhang zwischen dem Pterin-Molybdän-Cofaktor **37** und Urothion **33** (Schema 9).^[58] Aus den Strukturen von Urothion **33** und zwei weiteren fluoreszierenden Abbauprodukten des Cofaktors, die sie als „Form A“ **34** und „Form B“ **35** bezeichneten, leiteten sie ein Strukturmodell für den Pterin-Molybdän-Cofaktor **37** ab, das durch Charakterisierung des alkylierten Derivats Bis(carboxamidomethyl)-molybdopterin (camMPT) **36** bestätigt wurde.^[58, 59]

Die Herstellung alkylierter Derivate des Pterin-Molybdän-Cofaktors war ein wichtiger Fortschritt, da sie die Entdeckung der Molybdopterin-Dinucleotide ermöglichte. Diese waren bis dahin unerkannt geblieben, da es üblich war, das Vorhandensein des Pterin-Molybdän-Cofaktors in einem Enzym durch Überführen in „Form A“ **34** oder „Form B“ **35** zu demonstrieren. Die dazu erforderlichen drastischen

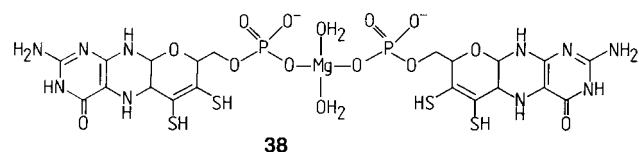


Schema 9. Einige Pterin-Molybdän-Cofaktoren und verwandte Verbindungen.^[59] R = O, S, Se.

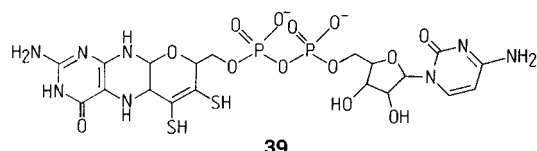
Bedingungen führen zur Spaltung von Pyrophosphatbrücken, so daß immer **34** oder **35** entstand – unabhängig davon, ob primär Molybdopterin oder ein Molybdopterin-Dinucleotid vorgelegen hatte. Der direkte Beweis für die Existenz einer Dinucleotid-Variante des Pterin-Molybdän-Cofaktors gelang 1990, als ein alkyliertes Cofaktorderivat aus der Dimethylsulfoxid-Reduktase von *Rhodobacter sphaeroides* isoliert wurde, das nach Behandeln mit Pyrophosphatase in camMPT **36** und Guaninmonophosphat (GMP) zerfiel.^[60] Damit war bewiesen, daß Molybdopterin-Guanin-Dinucleotid (MGD) der organische Teil des Pterin-Molybdän-Cofaktors ist. Wenig später fand man Molybdopterin-Cytosin-Dinucleotid (MCD) in der Kohlenmonoxid-Dehydrogenase von *Pseudomonas carboxydoflava*.^[61] Inzwischen wurden MGD und MCD in zahlreichen molybdänhaltigen Enzymen nachgewiesen. Im allgemeinen liegt in Enzymen mit einem Pterin-Molybdän-Cofaktor nur Molybdopterin, nur MCD oder nur MGD vor; der Cofaktor der Formylmethanofuran-Dehydrogenase aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* enthält aber neben MGD auch die Purin-Dinucleotide Molybdopterin-Adenin-Dinucleotid und Molybdopterin-Hypoxanthin-Dinucleotid.^[62]

Große Fortschritte bei der Aufklärung struktureller Besonderheiten der Pterin-Molybdän-Cofaktoren brachten die Röntgenstrukturanalysen an Kristallen der Aldehyd-Ferredoxin-Oxidoreduktase aus *Pyrococcus furiosus* (einem hyperthermophilen Archaeon),^[63] der Aldehyd-Oxidoreduktase des Sulfat-Reduzierers *Desulfovibrio gigas*^[64] und der Dimethylsulfoxid-Reduktase der phototrophen Bakterien *Rhodobacter sphaeroides* und *Rhodobacter capsulatus*.^[65] Die Aldehyd-Ferredoxin-Oxidoreduktase aus *Pyrococcus furiosus* besteht aus zwei identischen Untereinheiten, von denen jede einen [4Fe-4S]-Cluster und einen dem Pterin-Molybdän-Cofaktor analogen Wolfram-Cofaktor enthält. In jeder Untereinheit des Enzyms sind zwei Pterinmoleküle über ihre Phosphatgruppen, die axial an ein Magnesiumion koordinieren, miteinander verbunden. Beide Pterinmoleküle komplexieren mit insgesamt vier Schwefeldonoren ein Wolframzentrum; Proteinliganden sind hingegen nicht an das Wolframzentrum koordiniert. Das Pterinsystem ist modifiziert: Durch

Ringschluß zwischen der OH-Gruppe der Seitenkette und C7 der Pterineinheit entsteht ein dritter anellierter Ring (Schema 10). Diese Bis(molybdopterin)verbindung **38** führte



38



39

Schema 10. Strukturmodelle für die Pterin-Molybdän-Cofaktor-Varianten nach Chan et al.^[63]

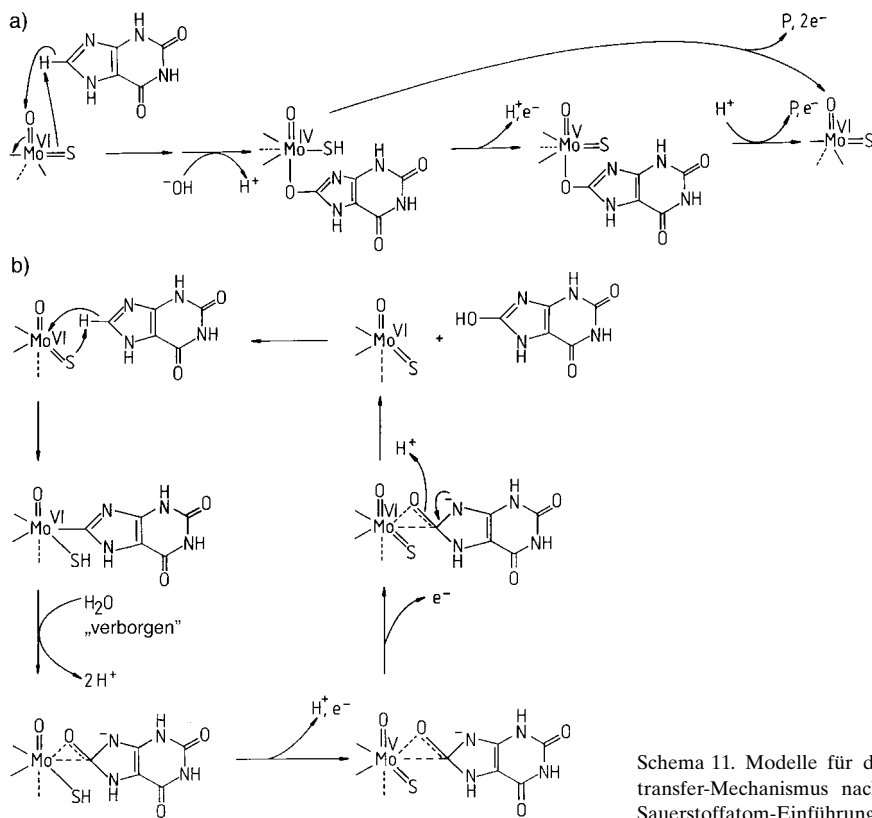
zu der Vermutung, daß in den Dinucleotid-Formen des Pterin-Molybdän-Cofaktors bereits ein Molekül Pterin-Dinucleotid genügt, um Molybdän zu komplexieren. Das zweite Pterinmolekül könnte durch das Nucleotid ersetzt werden, wenn zur Metallbindung nicht die Schwefelatome der Dithioleneinheit, sondern die Hydroxysauerstoffatome der Ribose genutzt werden.^[63]

Die Aldehyd-Oxidoreduktase aus *Desulfovibrio gigas* ist ein homodimeres Enzym. Es enthält in jeder Untereinheit zwei verschiedene [2Fe-2S]-Cluster sowie MCD als Dinuc-

leotidform des Pterin-Molybdän-Cofaktors. Die Aminosäuresequenz dieser Aldehyd-Oxidoreduktase weist keine Homologie zum oben beschriebenen Wolframprotein Aldehyd-Ferredoxin-Oxidoreduktase aus *Pyrococcus furiosus* auf. Analog zu **38** enthält der Cofaktor, **39**, eine tricyclische Einheit. Das Molybdän(vi)-Zentrum, das in der oxidierten Form des Enzyms vorliegt, wird fünfzählig durch zwei Schwefelatome der Dithioleneinheit und drei Sauerstoffdonoren koordiniert, die als zwei Oxoliganden und ein Aqualigand identifiziert wurden.^[64] Dieser Strukturvorschlag^[64] unterscheidet sich allerdings von dem von Chan et al.,^[63] die eine Beteiligung der OH-Gruppen des Zuckers an der Molybdänbindung postuliert hatten.

Die Röntgenstrukturanalyse der kristallisierten Aldehyd-Oxidoreduktase aus *Desulfovibrio gigas* ermöglichte einen Einblick in einige mechanistische Besonderheiten der Aldehyd-Oxidation und der internen Elektronenübertragung. Das auf das Substrat übertragene Sauerstoffatom stammt entweder aus dem Wassermolekül, das dem Molybdän am nächsten ist, oder es ist ein an das Molybdänatom gebundenes Donoratom. Diese Möglichkeit der Übertragung dieses Donoratoms wurde von Hille et al. schon vor einiger Zeit für die Xanthin-Oxidase-Reaktion vorgeschlagen.^[55] Nach diesem Modell geht das leicht ablösbare Sauerstoffatom der Mo=O-Gruppe in jedem Katalysezyklus auf das Substrat über. Da das im Produkt eingebaute Sauerstoffatom aus Wasser stammt, muß die Oxogruppe des Molybdäns aus dem Lösungsmittel regeneriert werden.

Daher wurde vorgeschlagen, daß bei dieser Reaktion zunächst ein Proton vom Xanthin abstrahiert wird und das gebildete Carbanion an der Mo=O-Gruppe angreift (Sche-

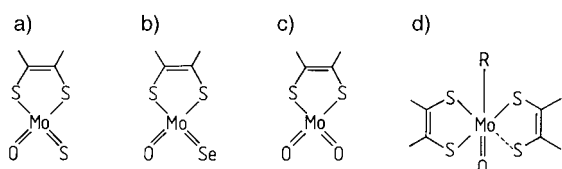


Schema 11. Modelle für die Katalyse der Xanthin-Oxidase-Reaktion. a) Oxo-transfer-Mechanismus nach Hille et al.,^[55] P=Produkt. b) Mechanismus der Sauerstoffatom-Einführung nach Howes et al.^[66]

ma 11 a).^[55] Neuere kinetische sowie ^{17}O - und ^{13}C -Elektron-Kern-Doppelresonanz(ENDOR)-spektroskopische Untersuchungen wiesen allerdings auf eine Molybdän-Kohlenstoff-Bindung während der katalytischen Reaktion der Xanthin-Oxidase hin. Diese Ergebnisse und Strukturanalysen der Aldehyd-Oxidoreduktase aus *Desulfovibrio gigas* führten zu einem alternativen Vorschlag für den Mechanismus, bei dem anstelle der direkten Beteiligung des Oxo-Liganden die Übertragung eines Molybdän-gebundenen Wassermoleküls auf das Substrat angenommen wird.^[66] Das Katalysemodell für die Xanthin-Oxidase-Reaktion wird daher nicht als „Oxotransfer“, sondern als „Sauerstoffatom-Einführung“ bezeichnet. Dabei wird das Substrat formal an die $\text{Mo}=\text{S}$ -Doppelbindung des katalytischen Zentrums der Xanthin-Oxidase addiert. Daraufhin greift ein „verborgenes“ Wassermolekül (aus der Nähe des Molybdänzentrums oder evtl. dessen Ligand) das Molybdän-gebundene Kohlenstoffatom des Substrats an (Schema 11 b). Das in das Produkt Harnsäure eingebaute Sauerstoffatom stammt also aus diesem Wassermolekül und nicht aus der Oxo-Gruppe. In diesem Modell kommt dem Oxo-Molybdän-Liganden somit keine aktive Rolle bei der Reaktion zu.^[66]

Strukturdaten der Dimethylsulfoxid-Reduktase von *Rhodobacter sphaeroides* ergaben, daß dieses Protein zu einer anderen Gruppe Pterin-Molybdän-Cofaktor-haltiger Enzyme gehört. Es ähnelt weder der Aldehyd-Ferredoxin-Oxidoreduktase aus *Pyrococcus furiosus* noch der oben beschriebenen Aldehyd-Oxidoreduktase aus *Desulfovibrio gigas*. Die monomere *Rhodobacter*-Dimethylsulfoxid-Reduktase enthält zwei MGD-Einheiten, die das Molybdänatom über die Dithioleneinheiten asymmetrisch koordinieren. Ein Sauerstoffdonor aus der Seitenkette eines Serinrestes des Proteins komplexiert das Metallion zusätzlich.^[65]

In bezug auf das Molybdänzentrum im Pterin-Molybdän-Cofaktor lassen sich die Enzyme in drei Hauptklassen einteilen (Schema 12):^[65] Zum einen gibt es Enzyme mit einem



Schema 12. Molybdän(vi)-Zentren in Enzymen mit einem Pterin-Molybdän-Cofaktor.^[65] a) Monooxo-Monosulfido-Typ, b) Monooxo-Monoselenido-Typ, c) Dioxo-Typ, d) Monooxo-Typ; R = Serin, Cystein, Selenocystein.

Molybdänzentrum des Monooxo-Monosulfido-Typs, als deren Prototyp die Xanthin-Oxidase gilt. Auch die Aldehyd-Oxidoreduktase aus *Desulfovibrio gigas* gehört in diese Enzymgruppe, die häufig als „Xanthin-Oxidase-Familie“ bezeichnet wird. Xanthin-Dehydrogenase und Nicotinsäure-Dehydrogenase aus einigen anaeroben Bakterien bilden eine Untergruppe, da sie offensichtlich, wie für die Nicotinsäure-Hydroxylase aus *Clostridium barkeri* nachgewiesen, ein Monooxo-Monoselenido-Molybdän-Zentrum enthalten.^[67] Die zweite Enzymgruppe wird durch die Sulfitoxidase repräsentiert, die über ein Molybdänzentrum vom Dioxo-Typ verfügt.

Die dritte Enzymgruppe, für die die Dimethylsulfoxid-Reduktase repräsentativ ist, hat ein Molybdänzentrum vom

Monooxo-Typ sowie einen Proteinliganden am Molybdänatom. Dieser kann wie bei der oben beschriebenen Dimethylsulfoxid-Reduktase aus *Rhodobacter sphaeroides* ein Serinrest sein, ein Cysteinrest oder auch ein Selenocysteinrest wie bei der Formiat-Dehydrogenase H aus *Escherichia coli*.^[68] Die molybdänhaltigen Hydroxylasen, die eine Hydroxylierung in Nachbarstellung zum Heteroatom oder an C4 des Chinolinrings katalysieren, sind der ersten Enzymgruppe, der „Xanthin-Oxidase-Familie“, zuzurechnen. Alle von unserer Arbeitsgruppe charakterisierten Enzyme enthielten Molybdopterin-Cytosin-Dinucleotid (MCD), ihr Molybdänzentrum gehörte zum Monooxo-Monosulfido-Typ.^[69–75]

4.2. Molybdänhaltige Hydroxylasen im bakteriellen Abbau von Chinolin und seinen Derivaten

4.2.1. Biochemie

4.2.1.1. Strukturelle Eigenschaften

Bei ersten Untersuchungen zum Chinolinabbau durch *Pseudomonas putida* 86 erkannten wir, daß die Biotransformation von Chinolin **10** zu 1H-2-Oxochinolin **12** molybdänabhängig ist (siehe Abschnitt 4.1).^[76] Da die molybdänabhängigen eukaryotischen Xanthin-Oxidasen über eine ziemlich breite Substratspezifität verfügen und daher auch viele N-heterocyclische Verbindungen hydroxylieren,^[77] vermuteten wir zunächst, daß eine bakterielle Xanthin-Dehydrogenase am Chinolinabbau beteiligt ist. Diese Hypothese wurde aber widerlegt, als in *Pseudomonas putida* 86 zwei molybdänhaltige Hydroxylasen entdeckt wurden: Die gereinigte Xanthin-Dehydrogenase dieses Stammes bestand aus zwei verschiedenen, in einer $\alpha_4\beta_4$ -Struktur angeordneten Untereinheiten, während die Chinolin-2-Oxidoreduktase dieses Stammes ein heterotrimeres Protein ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$) war. Beide Enzyme enthalten FAD und $[2\text{Fe-2S}]$ -Zentren, unterscheiden sich aber im organischen Teil ihres Pterin-Molybdän-Cofaktors: Xanthin-Dehydrogenase enthält Molybdopterin (MPT), die Chinolin-2-Oxidoreduktase dagegen Molybdopterin-Cytosin-Dinucleotid (MCD).^[69, 78, 79] Die Enzyme unterscheiden sich in ihren Substratspezifitäten: Die Xanthin-Dehydrogenase setzt kein Chinolin **10** um, die Chinolin-2-oxidoreduktase hingegen kein Xanthin und Hypoxanthin. Chinazolin (1,3-Benzodiazin) **46** wird als einziges Substrat sowohl von der Chinolin-2-Oxidoreduktase als auch von der Xanthin-Dehydrogenase hydroxyliert.

Chinolin-2-Oxidoreduktasen katalysieren die Umsetzung von Chinolin **10** zu 1H-2-Oxochinolin **12**. Sie wurden nicht nur aus *Pseudomonas putida* 86, sondern auch aus *Rhodococcus* sp. B1 und *Comamonas testosteroni* 63 isoliert.^[25, 70, 76, 79] Alle drei Enzyme sind kompliziert gebaute Molybdo-Eisen-Schwefel-Flavoproteine. Die enzymatische Reaktion läuft in vitro nur in Gegenwart eines künstlichen Elektronenacceptors ab; der physiologische Elektronenacceptor für die Chinolin-2-Oxidoreduktasen wurde bislang noch nicht identifiziert.

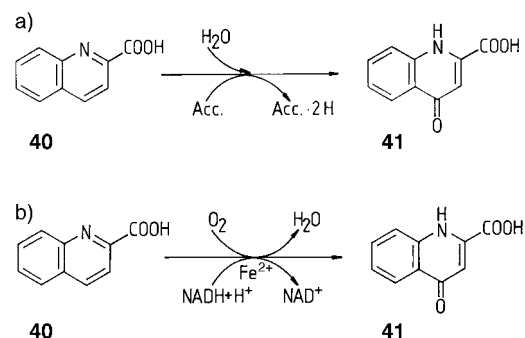
Über den bakteriellen Katabolismus von Isochinolin gibt es anders als über den von Chinolin **10** nur wenige Veröffentlichungen. Einige Bakterienstämme, die Isochinolin als einzige

Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen, wurden beschrieben.^[80] Diese Stämme scheinen zuerst Isochinolin zu 2H-1-Oxoisochinolin umzusetzen. Die vollständigen Abbauege, die bei *Brevundimonas diminuta* 7 über Phthalsäure und Protocatechusäure verlaufen könnten,^[81] müssen aber noch aufgeklärt werden. Isochinolin-1-Oxidoreduktase katalysiert die Hydroxylierung an C1 von Isochinolin. Dabei wird ein Elektronenacceptor reduziert. Das native Enzym, das aus *Brevundimonas diminuta* 7 erhalten wurde,^[75] ist ein heterodimeres Molybdo-Eisen-Schwefel-Protein ohne Flavin-Cofaktor.

Die Chinaldin-4-Oxidase aus dem Gram-positiven Bakterium *Arthrobacter* sp. Rü61a katalysiert den ersten Schritt des Abbaus von Chinaldin **1** (Schema 1a).^[22] Dieses wird dabei unter Reduktion eines Elektronenacceptors zu 1H-4-Oxochinaldin **2** umgesetzt. Das Enzym kann als Oxidase oder Dehydrogenase wirken, der physiologische Elektronenacceptor ist vermutlich Sauerstoff.^[72] Auch bei zwei Chinaldinsäure-4-Oxidoreduktasen wurden Hydroxylierungen in 4-Stellung des N-Heterocyclus beschrieben.^[74, 82]

Viele bakterielle molybdänhaltige Hydroxylasen, die den nucleophilen Angriff auf einen N-Heterocyclus entweder in 2- oder in 4-Stellung zum N-Heteroatom katalysieren, sind Molybdo-Eisen-Schwefel-Flavoproteine. Im einzelnen sind dies Xanthin-Dehydrogenasen,^[78, 83] Nicotinsäure- und 6-Hydroxynicotinsäure-Dehydrogenase aus *Bacillus niacini*,^[84] Iso-nicotinsäure-Dehydrogenase aus *Mycobacterium* sp. INA 1,^[85] Nicotin-Dehydrogenase aus *Arthrobacter oxidans*,^[86] Chinolin-2-Oxidoreduktasen,^[25, 70, 76, 79] Chinaldin-4-Oxidase aus *Arthrobacter* sp. Rü61a,^[71, 72] Chinaldin-4-carbonsäure-2-Oxidoreduktase aus *Agrobacterium* sp. 1B^[73] und Chinaldinsäure-4-Oxidoreduktase aus *Pseudomonas* sp. AK-2.^[74] Diese prokaryotischen Enzyme enthalten einen Pterin-Molybdän-Cofaktor, Eisen-Schwefel-Zentren und FAD; sie sind wahrscheinlich mit den eukaryotischen molybdänhaltigen Hydroxylasen Aldehyd-Oxidase und Xanthin-Oxidase verwandt. Aber auch prokaryotische molybdänhaltige Hydroxylasen ohne Flavin-Cofaktor kommen vor, z. B. die heterodimeren Enzyme Chinaldinsäure-4-Oxidoreduktase aus *Serratia marcescens* 2CC-1 und die bereits erwähnte Isochinolin-1-Oxidoreduktase aus *Brevundimonas diminuta* 7.^[82, 75] In diese Untergruppe der Molybdo-Eisen-Schwefel-Proteine gehört auch die in Abschnitt 4.1 besprochene homodimere Aldehyd-Oxidoreduktase aus *Desulfovibrio gigas*.

In Tabelle 1 sind die am bakteriellen Katabolismus von Chinolinderivaten beteiligten molybdänhaltigen Hydroxylasen und einige ihrer Eigenschaften zusammengefasst. Es sind zwei Chinaldinsäure-4-Oxidoreduktasen bekannt, die sich sowohl in ihrer Struktur als auch in ihrem Satz redoxaktiver Zentren unterscheiden. Dennoch katalysieren beide Enzyme den nucleophilen Angriff an C4 von Chinaldinsäure **40**, wobei das Sauerstoffatom aus einem Wassermolekül in das Substrat eingeführt wird (Schema 13). Genau diese Umsetzung, d. h.



Schema 13. Enzymkatalysierte Umsetzung von Chinaldinsäure **40** zu Kynurensäure **41**.^[87] a) Chinaldinsäure-4-Oxidoreduktasen aus *Serratia marcescens* 2CC-1 und *Pseudomonas* sp. AK-2. b) Chinaldinsäure-4-Monooxygenase aus *Alcaligenes* sp. F2. Acc. = Elektronenacceptor.

die Bildung von Kynurensäure **41** aus **40**, wird bei einem *Alcaligenes*-Stamm von einer Monooxygenase katalysiert, die elektrophil angreift und dabei ein Sauerstoffatom aus molekularem Sauerstoff ins Substrat einbaut.^[87] Demnach kann die gleiche Reaktion in verschiedenen Bakterien von Enzymen katalysiert werden, die zu verschiedenen Klassen gehören und sich daher auch im Katalysemechanismus grundlegend unterscheiden.

4.2.1.2. Substratspezifität und Aldehydoxidation

Die Untersuchung der Substratspezifität von Chinaldin-4-Oxidase ergab, daß dieses Enzym außer Chinaldin **1** auch 8-Chlorchinaldin, Chinolin **10**, 2- und 8-Chlorchinolin, Isochinolin sowie die Benzodiazine Cinnolin (1,2-Benzodiazin), Chinazolin (1,3-Benzodiazin) **46** und Phthalazin (2,3-Benzodiazin) **44**, umsetzt. Erstaunlicherweise wurden diese Substrate (außer **44**) mit weitaus höherer katalytischer Aktivität

Tabelle 1. Molybdänhaltige Hydroxylasen, die am bakteriellen Abbau von Chinolinen beteiligt sind.

Enzym (Organismus)	M[kDa]	M[kDa] (Untereinheiten)	Struktur	Moco ^[a, b]	FeS ^[b]	Flavin ^[b]
Chinolin-2-Oxidoreduktase (<i>Pseudomonas putida</i> 86)	300	85, 30, 18	$\alpha_2\beta_2\gamma_2$	(2)MCD ^[c]	(2)[2Fe-2S]I (2)[2Fe-2S]II ^[e]	(2)FAD
Chinaldin-4-Oxidase (<i>Arthrobacter</i> sp. Rü61a)	340	82, 35, 22	$\alpha_2\beta_2\gamma_2$	(2)MCD ^[c]	(2)[2Fe-2S]I (2)[2Fe-2S]II ^[e]	(2)FAD
Chinaldinsäure-4-Oxidoreduktase (<i>Pseudomonas</i> sp. AK-2)	300	90, 34, 20	$\alpha_2\beta_2\gamma_2$	(2)MCD ^[c]	(8)Fe, (8)S	(2)FAD
Chinaldinsäure-4-Oxidoreduktase (<i>Serratia marcescens</i> 2CC-1)	100	80, 18	$\alpha\beta$	– ^[d]	(3–4)Fe	–
Isochinolin-1-Oxidoreduktase (<i>Brevundimonas diminuta</i> 7)	95	80, 16	$\alpha\beta$	(1)MCD ^[c]	(1)[2Fe-2S]I (1)[2Fe-2S]II ^[e]	–

[a] Pterin-Molybdän-Cofactor. [b] In Klammern: Zahl der Cofaktoren pro Enzymmolekül. [c] Molybdopterin-Cytosin-Dinucleotid. [d] Nicht bestimmt. [e] Abgeleitet aus EPR-spektroskopischen Daten.

hydroxyliert als Chinaldin **1** selbst. Das erschwert die Enzymnomenklatur: Trotz seines Namens, der auf die Verwertung von **1** durch *Arthrobacter* sp. R61a (Schema 1a) zurückgeht,^[22] setzt das Enzym eine Reihe N-heterocyclischer Substrate mit signifikant höherer Geschwindigkeit um als **1**.^[72]

Durch vergleichende Untersuchungen der Substratspezifitäten von Chinaldin-4-Oxidase, Chinolin-2-Oxidoreduktase und Isochinolin-1-Oxidoreduktase sollte festgestellt werden, ob auch andere am bakteriellen Abbau von aromatischen N-Heterocyclen beteiligte molybdänhaltige Hydroxylasen über ein solch breites Substratspektrum verfügen (Tabelle 2). Chinolin **10** wurde von der Chinaldin-4-Oxidase und von

Tabelle 2. Enzymkatalysierte Hydroxylierung von Chinolinen und Benzodiazinen.

Enzym	Substrat	Produkt
Chinaldin-4-Oxidase	Chinolin 10	1H-4-Oxochinolin 7
	Chinaldin 1	1H-4-Oxochinaldin 2
	Isochinolin	2H-1-Oxoisoquinolin
	Phthalazin 44	2H-1-Oxophthalazin 45
	Chinazolin 46	3H-4-Oxochinazolin 48
Chinolin-2-Oxidoreduktase	Cinnolin	1H-4-Oxocinnolin
	Chinolin 10	1H-2-Oxochinolin 12
	Chinazolin 46	1H-2-Oxochinazolin
	Chinoxalin 42	1H-2-Oxochinoxalin 43
Isochinolin-1-Oxidoreduktase	Isochinolin	2H-1-Oxoisoquinolin
	Phthalazin 44	2H-1-Oxophthalazin 45
	Chinazolin 46	3H-4-Oxochinazolin 48

der Chinolin-2-Oxidoreduktase als Substrat akzeptiert, wobei 1H-4-Oxochinolin **7** bzw. 1H-2-Oxochinolin **12** entstanden. Demnach katalysiert die Chinaldin-Oxidase einen regiospezifischen Angriff an Position 4 auch dann, wenn das dem N-Heteroatom benachbarte Kohlenstoffatom nicht durch einen Substituenten blockiert ist. Isochinolin und Phthalazin **44** sind nicht nur Substrate für die Isochinolin-1-Oxidoreduktase, sondern auch für die Chinaldin-4-Oxidase. Beide Enzyme bilden die gleichen Produkte, nämlich 2H-1-Oxoisoquinolin und 2H-1-Oxophthalazin **45**. Chinazolin **46** wird als einziges Substrat von allen drei Enzymen akzeptiert. Chinaldin-4-Oxidase und Isochinolin-1-Oxidoreduktase bildeten 3H-4-Oxochinazolin **48**, dagegen hydroxylierte die Chinolin-2-Oxidoreduktase an C2, d. h. in Nachbarstellung zu N1 und N3. Offensichtlich erfolgen Hydroxylierungen mit Chinolin-2-Oxidoreduktase und Isochinolin-1-Oxidoreduktase unabhängig vom Substrat ausschließlich in Nachbarstellung zum Heteroatom. Die Chinaldin-4-Oxidase ist vielseitiger: Der regiospezifische nucleophile Angriff in 2- oder 4-Position zum N-Atom hängt vom Substrat ab (Tabelle 2).^[72] Außer diesen prokaryotischen Enzymen, die alle am bakteriellen Abbau von Chinolin **10** und seinen Derivaten beteiligt sind, katalysieren auch die eukaryotischen molybdänhaltigen Hydroxylasen Xanthin-Oxidase aus Kuhmilch und Aldehyd-Oxidase aus Rattenleber die Oxidation von N-Heterocyclen.^[77, 88] Diese beiden Enzyme setzen auch Aldehyde zu den entsprechenden Carbonsäuren um.^[89]

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von Isochinolin-1-Oxidoreduktase und anderen molybdänhaltigen Hydroxylasen ließ Ähnlichkeiten mit zwei Aldehyd-Oxidoreduktasen

erkennen, von denen eine aus dem industriell genutzten Essigproduzenten *Acetobacter polyoxogenes*, die andere aus dem Sulfatreduzierer *Desulfovibrio gigas* stammt (Abschnitt 4.2.3).^[90] Deshalb wurden die Substratspezifitäten von Isochinolin-1-Oxidoreduktase, Chinolin-2-Oxidoreduktase und Chinaldin-4-Oxidase gegenüber Aldehyden untersucht. Überraschenderweise katalysieren Chinaldin-4-Oxidase und Isochinolin-1-Oxidoreduktase die Oxidation von Aldehyden, besonders die von aromatischen. Bevorzugte Substrate der Chinaldin-4-Oxidase sind Benzaldehyd und Salicylaldehyd (2-Hydroxybenzaldehyd). Auch Zimtaldehyd (3-Phenyl-2-propenal) und Vanillin (4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd) wurden zu den entsprechenden Carbonsäuren umgesetzt – wenn auch mit erheblich geringeren Geschwindigkeiten. Kurzkettige aliphatische Aldehyde wurden dagegen nicht oxidiert. Isochinolin-1-Oxidoreduktase gleicht in ihrem Substratspektrum der Chinaldin-4-Oxidase. Salicylaldehyd und Benzaldehyd erwiesen sich für die Isochinolin-1-Oxidoreduktase allerdings als Suizid-Substrate. Im Gegensatz zu Chinaldin-4-Oxidase und Isochinolin-1-Oxidoreduktase, die gegenüber aromatischen Aldehyden aktiver sind als gegenüber aliphatischen, setzen die beschriebenen prokaryotischen Aldehyd-Oxidoreduktasen kurzkettige aliphatische Aldehyde viel besser um.^[72] Hingegen scheint die eukaryotische Aldehyd-Oxidase, ein molybdänhaltiges Enzym, dessen Substratspezifität gegenüber N-Heterocyclen und Aldehyden gut untersucht ist, der Chinaldin-4-Oxidase und der Isochinolin-1-Oxidoreduktase ähnlich zu sein. Es katalysiert die Hydroxylierung von N-Heterocyclen (Chinolin, Chinaldin, Isochinolin, Cinnolin, Chinazolin) und die Oxidation von aromatischen Aldehyden mit ähnlichen Geschwindigkeiten.^[89]

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen die Vielseitigkeit der molybdänhaltigen Hydroxylasen erkennen. Sogar die Differenzierung zwischen Aldehyd-Oxidoreduktasen und Enzymen, die N-Heterocyclen hydroxylieren, erscheint problematisch.^[72] Da Aldehyde wegen ihrer Reaktivität cytotoxisch sind, könnten den entsprechenden molybdänhaltigen Hydroxylasen wichtige Entgiftungsfunktionen in pro- und eukaryotischen Zellen zukommen.

4.2.2. Biophysik

Die interne Elektronentransportkette der Chinolin-2-Oxidoreduktase aus *Pseudomonas putida* 86 besteht aus vier redoxaktiven Zentren (siehe auch Tabelle 1) – FAD, zwei unterschiedlichen [2Fe-2S]-Zentren und einem Molybdän-MCD. Jedes dieser Zentren durchläuft im Redoxcyclus des Enzyms einen paramagnetischen Zustand, der EPR-spektroskopisch untersucht werden kann.^[79]

Bei der Reduktion von Chinolin-2-Oxidoreduktase mit Dithionit oder Chinolin **10** wird ein Radikal gebildet; die Linienbreite von dessen EPR-Signal ist mit 1.9 mT typisch für die neutrale (blaue) Flavin-Radikal-Spezies. Ein ähnliches Signal wird auch bei der eukaryotischen Xanthin-Oxidase (aus Kuhmilch) erhalten.^[91] In den EPR-Spektren lassen sich zwei Eisen-Schwefel-Zentren unterscheiden: Nach der Reduktion von Chinolin-2-Oxidoreduktase mit Dithionit oder dem Substrat Chinolin **10** lassen sich <60 K rhombische Signale auflösen. Entsprechend der Konvention in der

Literatur wird die Spezies, deren Signal die geringere g -Faktor-Anisotropie aufweist, als FeSI, die andere als FeSII bezeichnet (Abb. 2a–c).^[92, 93] Die g -Faktoren variieren bei

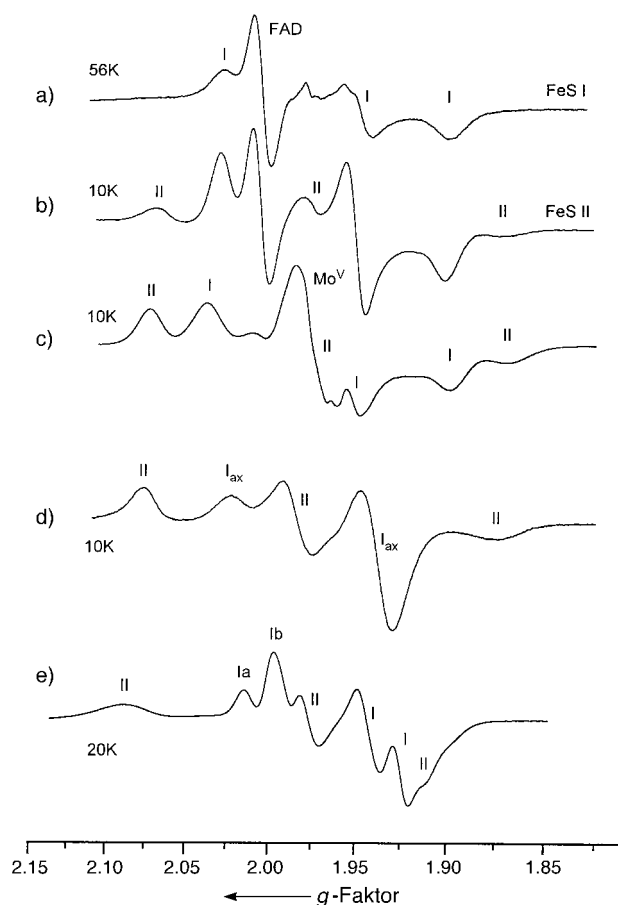


Abb. 2. EPR-Signale der Eisen-Schwefel-Cluster. a)–c) Chinolin-2-Oxidoreduktase, a) mit Dithionit reduziert, Messung bei 56 K, b) bei 10 K, c) mit Chinolin **10** reduziert, Messung bei 10 K. Signale des FAD-Radikals und eines verbreiterten Mo^V-Signals sind eingezeichnet. d) Chinaldin-4-Oxidase, mit Dithionit reduziert. e) Isochinolin-1-Oxidoreduktase, mit Dithionit reduziert.

FeSI in einem Bereich, wie er auch bei den Eisen-Schwefel-Zentren anderer Proteine zu finden ist. Dies deutet auf ähnliche stereochemische und elektronische Eigenschaften der signalgebenden Spezies bei FeSI von pro- und eukaryotischen Enzymen hin. Die wesentlich ausgeprägtere Variabilität der signalgebenden Spezies bei FeSII drückt sich in signifikanten Unterschieden im g -Tensor des Signals aus. Unter den molybdänhaltigen Hydroxylasen nimmt diese FeSII-Spezies daher eine Sonderstellung ein.

Titrationsexperimente mit Natriumdithionit-Lösungen in Gegenwart verschiedener Mediatoren ergaben Redoxpotentiale von -155 mV für FeSI und -195 mV für FeSII. Dies sind die höchsten Werte, die bisher für [2Fe-2S]-Cluster in molybdänhaltigen Hydroxylasen gemessen wurden. Das Molybdänzentrum ist für die Katalyse und als vermutete Substratbindungsstelle von besonderem Interesse. Das EPR-Spektrum von oxidiert, isolierter Chinolin-2-Oxidoreduktase bei 77 K (Abb. 3a) hat rhombische Symmetrie und ähnelt

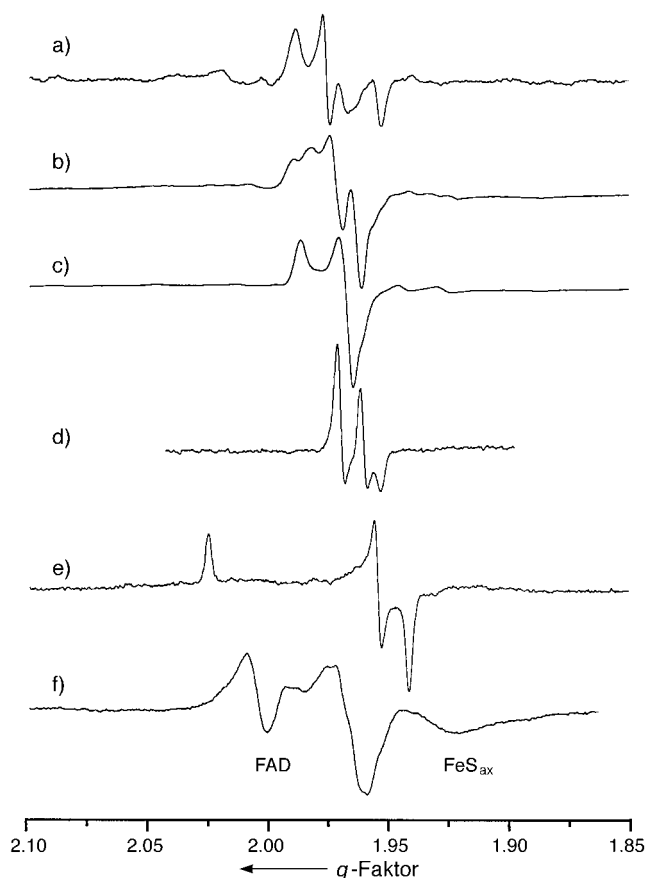


Abb. 3. EPR-Signale von Mo^V-Spezies. a)–c) Chinolin-2-Oxidoreduktase. a) „Resting Q“. b) „Rapid Q“ in H₂O-Puffer. c) „Rapid Q“ in D₂O-Puffer; die durch das Thiolproton bedingte Hyperfeinaufspaltung ist nicht mehr zu erkennen. d) „Slow Q“ der cyanidbehandelten Desulfo-Form. e) Isochinolin-1-Oxidoreduktase: „Very Rapid I“; das Signal wurde durch Subtraktion der Spektren nach unterschiedlichen Inkubationszeiten erhalten. f) Chinaldin-4-Oxidase, unter anaeroben Bedingungen mit dem Substrat Chinaldin **1** reduziert. Alle Spektren wurden bei 77 K gemessen.

dem Spektrum der Mo^V-„Resting“-Spezies von Xanthin-Oxidase, Aldehyd-Oxidase und Kohlenmonoxid-Oxidase.^[79] Es repräsentiert eine inaktive Mo^V-Spezies, die in geringer Konzentration ($<5\%$ der Mo-Gesamtkonzentration) in allen Präparationen vorhanden ist. Die Reduktion des Enzyms mit dem Substrat oder mit Dithionit induziert ein intensives EPR-Signal einer weiteren Mo^V-Spezies (Abb. 3b), die wegen des Ursprungs und der Ähnlichkeit des Signals mit dem „Rapid“-Signal der Xanthin-Oxidase aus Kuhmilch als „Rapid Q“ bezeichnet wird.^[92] Das herausragende Merkmal dieses Signals ist eine Kopplung mit dem Thiolproton; dieses Proton ist wie bei der Xanthin-Oxidase in D₂O-Puffer leicht austauschbar (Abb. 3c).

Kleine Unterschiede der Hyperfein-Kopplungen von Proben, die mit Chinolin **10** oder mit Dithionit reduziert wurden, reflektieren den Einfluß des Substrats (oder des Produkts) in unmittelbarer Umgebung des Mo^V-Zentrums. Der direkte Nachweis einer Komplexbildung kann allerdings EPR-spektroskopisch nicht erbracht werden. Die Hyperfein-Wechselwirkung des Metallkerns mit $I=5/2$ führt bei ⁹⁵Mo-angereicherter Chinolin-2-Oxidoreduktase zu einem Sextett. Die Simulation dieses Linienmusters deutet auf das Zusammen-

fallen einer Hauptkomponente des g - und des Hyperfeintensors hin, wie es für einen C_2 -symmetrischen Komplex charakteristisch ist. Die katalytisch relevante „Very-rapid“- Mo^V -Spezies, die in der Xanthin-Oxidase bei Rapid-freeze-Experimenten im Millisekundenbereich detektiert wurde, tritt bei Chinolin-2-Oxidoreduktase nur in sehr kleinen Mengen auf, wenn Chinolin **10** und das Nicht-Substrat Chinaldin **1** kompetitiv binden.

Chinolin-2-Oxidoreduktase aus *Pseudomonas putida* 86 hat ein durch Cyanid inaktivierbares Monooxo-Monosulfido-Molybdänzentrum (Schema 12), wie durch Bildung von Thiocyanat und Reaktivierung des inaktiven Enzyms nach Behandeln mit Sulfid nachgewiesen wurde. Cyanid abstrahiert das sogenannte cyanolysierbare Schwefelatom des Molybdänzentrums, das im inaktiven Desulfo-Zustand des Enzyms vermutlich in der Dioxo-Form vorliegt. In solchen Cyanid-Inaktivierungs-/Sulfid-Reaktivierungsexperimenten verhält sich Chinolin-2-Oxidoreduktase wie viele andere Molybdo-Eisen-Schwefel-Flavo-Proteine. So konnte wie bei der Desulfo-Form der Xanthin-Oxidase auch bei der Chinolin-2-Oxidoreduktase das Signal der Mo^V -„Slow-Q“-EPR-Spezies des inaktiven Desulfo-Zustands nachgewiesen werden. Es zeichnet sich durch einen leicht rhombischen g -Tensor und eine Protonen-Wechselwirkung aus, die in D_2O unterdrückt werden kann (Abb. 3 d).

Bei EPR-spektroskopischen Untersuchungen von Isochinolin-1-Oxidoreduktase aus *Brevundimonas diminuta* 7 trat kein Signal für das freie Radikal einer Flavin-Spezies auf. Dies stimmt mit biochemischen und genetischen Daten überein, durch die das Enzym als Flavin-freies Molybdo-Eisen-Schwefel-Protein charakterisiert wird. Nach der Reduktion des Enzyms mit Dithionit oder mit dem Substrat Isochinolin sind zwei rhombische EPR-Signale von Eisen-Schwefel-Zentren unterscheidbar. Bei Temperaturen unterhalb 30 K führt die magnetische Wechselwirkung zwischen den beiden Eisen-Schwefel-Zentren zu einer deutlichen Aufspaltung der g_1 -Komponente des $FeSI$ -Signals (Ia, Ib in Abb. 2 e). Demzufolge müssen die beiden Cluster räumlich eng benachbart sein. Während das $FeSII$ -Signal nur unterhalb 40 K auftrat, wurde das $FeSI$ -Signal bereits bei 77 K detektiert – einer für ein $[2Fe-2S]$ -Zentrum ungewöhnlichen Temperatur.

Bei der durch Reduktion mit dem Substrat Isochinolin induzierten Mo^V -Spezies „Rapid I“ war im EPR-Spektrum eine in D_2O unterdrückbare Protonen-Kopplung mit ähnlichen Parametern wie beim Signal der Spezies „Rapid Q“ der Chinolin-2-Oxidoreduktase zu erkennen. Eine weitere Mo^V -Spezies der Isochinolin-1-Oxidoreduktase, deren EPR-Signal nahezu identische magnetische Parameter aufweist wie das Signal der „Very-rapid“-Spezies von Chinolin-2-Oxidoreduktase und Xanthin-Oxidase, wird entsprechend als „Very-rapid I“ bezeichnet (Abb. 3 e). Trotz dieser Bezeichnung konnte das Signal dieser Spezies über mindestens 45 min verfolgt werden; damit unterscheidet sie sich stark von der sehr kurzlebigen intermediären Form der Xanthin-Oxidase. Möglicherweise wird bei der Isochinolin-1-Oxidoreduktase bei einem Substratüberschuß ein relativ stabiler (partiell inhibierter) Komplex zwischen Isochinolin und dem Mo^V -Zentrum gebildet.

Chinaldin-4-Oxidase und Chinolin-2-Oxidoreduktase haben ähnliche Molmassen und die gleiche Zusammensetzung ihrer Untereinheiten und Cofaktoren, worin sie sich von Isochinolin-1-Oxidoreduktase unterscheiden (Tabelle 1, Abschnitt 4.2.1.1). Auch die redoxaktiven Zentren der Chinaldin-4-Oxidase wurden EPR-spektroskopisch untersucht, um die am bakteriellen Abbau von Chinolinderivaten beteiligten molybdänhaltigen Hydroxylasen verglichen zu können. Im oxidierten, isolierten Zustand konnte unter aeroben Bedingungen bei der Chinaldin-4-Oxidase kein EPR-Signal nachgewiesen werden. Unter anaeroben Bedingungen war jedoch in Abwesenheit eines Substrats oder reduzierenden Agens eine organische Radikal-Spezies nachweisbar. Die Intensität dieses Signals bei $g = 2.0040$ verstärkte sich nach Zugabe von Chinaldin **1** (Abb. 3 f); die Linienbreite von 1.3 mT war charakteristisch für das anionische (rote) Flavin-Radikal.^[91] Im Unterschied dazu liegt bei Chinolin-2-Oxidoreduktase und der eukaryotischen Xanthin-Oxidase das neutrale (blaue) Radikal vor.

Mit Dithionit reduzierte Chinaldin-4-Oxidase wies bei 77 K ein charakteristisches axiales EPR-Signal eines Eisen-Schwefel-Zentrums ($FeSI_{ax}$) auf, wobei die Signalintensität bei niedrigerer Temperatur noch zunahm (Abb. 2 d, 3 f). Ferner war unterhalb von 60 K ein zweites rhombisches Signal für ein Eisen-Schwefel-Zentrum nachweisbar. Im Unterschied dazu haben die Signale der FeS -Zentren von Chinolin-2-Oxidoreduktase und Isochinolin-1-Oxidoreduktase rhombische Symmetrie. Die deutliche Axialität des Signals für das $FeSI_{ax}$ -Zentrum in Chinaldin-4-Oxidase sollte einer Ligandenanordnung höherer Symmetrie in diesem Eisen-Schwefel-Cluster entsprechen, als sie bei anderen Enzymen vorhanden ist.

Die durch Zugabe von Chinaldin **1** zu anaerob präparierten Proben erzeugte „Rapid“- Mo^V -Spezies erwies sich als äußerst empfindlich gegenüber geringsten Sauerstoffspuren. Das entsprechende axiale „Rapid“-Signal (Abb. 3 f) wies zwar eine wesentlich geringere spektrale Auflösung auf als das anderer Enzyme, doch verringerte sich die Linienbreite nach Austausch des H_2O -Puffers gegen einen D_2O -Puffer. Dieses Ergebnis deutet auf die Gegenwart austauschbarer Protonen am Molybdänzentrum hin, von denen eines wahrscheinlich das Proton der SH-Gruppe ist. Anders als bei Chinolin-2-Oxidoreduktase und Isochinolin-1-Oxidoreduktase konnten bisher weder die „Resting“- noch die „Very-rapid“-Spezies spektroskopisch nachgewiesen werden.

Die signifikanten Unterschiede in den EPR-Spektren der drei untersuchten Enzyme hängen mit den signalgebenden Spezies des Flavin-Radikals, der Eisen-Schwefel-Zentren und des Mo^V -Zentrums zusammen. Besonders für die Mo^V -Zentren konnten einige charakteristische Merkmale auf Strukturbesonderheiten zurückgeführt werden. Röntgenstrukturanalysedaten, die eine Korrelation der elektronischen und elektrochemischen Eigenschaften mit der Konfiguration der redoxaktiven Zentren ermöglichen sollten, dürften zu einem genaueren Verständnis der EPR-Daten führen. Wichtige Beiträge erwarten wir von den Hochauflösungs-EPR-Techniken – der ENDOR- und der Electron-Spin-Echo-Envelope-Modulation (ESEEM)-Spektroskopie.

4.2.3. Genetik

Um die Bindung der redoxaktiven Zentren durch bestimmte Peptid-Domänen der molybdänhaltigen Hydroxylasen zu verstehen und um die phylogenetische Beziehung der Enzyme aus der „Xanthin-Oxidase-Familie“ zu untersuchen, wurden die Gene, die für Isochinolin-1-Oxidoreduktase und für Chinolin-2-Oxidoreduktase kodieren, geklont, sequenziert und einer vergleichenden Sequenzanalyse unterworfen.^[90, 94] Die Aminosäuresequenzen der kleinen (IorA) und großen Untereinheit (IorB), die sich von der Nucleotidsequenz der *iorA*- und *iorB*-Strukturgene der heterodimeren Isochinolin-1-Oxidoreduktase (siehe Tabelle 1) ableiten, wiesen tatsächlich entsprechende Homologien 1. zu den kleinen (γ) und den großen (α) Untereinheiten der komplexen molybdänhaltigen Hydroxylasen ($\alpha\beta\gamma/\alpha_2\beta_2\gamma_2$) mit einem Pterin-Molybdän-Cofaktor und Monooxo-Monosulfido-Molybdänzentrum, 2. zu den N- und C-terminalen Bereichen der Aldehyd-Oxidoreduktase aus *Desulfovibrio gigas* und 3. zu den N- und C-terminalen Domänen der eukaryotischen Xanthindehydrogenasen auf. In IorAB gibt es keinen Bereich, der der FAD-bindenden mittleren Domäne eukaryotischer Xanthin-Dehydrogenasen entspricht, und in der Nähe der *iorAB*-Strukturgene war kein offenes Leseraster zu finden, das für ein FAD-haltiges Peptid kodiert.^[90]

Die für die Chinolin-2-Oxidoreduktase aus *Pseudomonas putida* 86 kodierenden *qor*-Gene sind geclustert und in der Transkriptionsrichtung 5'-*qorM*-S-L-3' angeordnet. Dies trifft auch auf alle bisher beschriebenen Strukturgene molybdänhaltiger Hydroxylasen mit $\alpha\beta\gamma$ - oder $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Struktur zu. Wir nehmen an, daß beide [2Fe-2S]-Zentren in der kleinen, das FAD in der mittleren und der Pterin-Molybdän-Cofaktor sowie die Substrat-Bindungsstelle in der großen Untereinheit lokalisiert sind. Diese Anordnung wurde schon früher für die Untereinheiten oder die entsprechenden Domänen anderer molybdänhaltiger Hydroxylasen diskutiert.^[53, 90, 94–98]

Vergleiche der Aminosäuresequenzen der kleinen Untereinheiten sowie Domänen von pro- und eukaryotischen Enzymen aus der „Xanthin-Oxidase-Familie“ mit den kleinen Untereinheiten der Chinolin-2-Oxidoreduktase (QorS) und Isochinolin-1-Oxidoreduktase (IorA) ergaben acht konservierte Cysteinreste, die vermutlich die beiden unterschiedlichen [2Fe-2S]-Zentren koordinieren, die bei den EPR-Studien entdeckt wurden (siehe Abschnitt 4.2.2).^[79, 92, 93, 99] Das Bindungsmotiv des N-terminalen [2Fe-2S]-Zentrums (Abb. 4a) ist der Signalsequenz des [2Fe-2S]-Ferredoxins vom bakteriellen und vom Chloroplast-Typ [CX₄CX₂CX_nC] homolog. Dabei ist X eine beliebige Aminosäure, n beträgt

a)		★	↓					↓	★		↓						↓	
MenS	G	C	G	E	G	G	C	G	A	C	T	V	X ₁₈	A	C	[42 - 73]		
MauS	G	C	G	E	G	G	C	G	A	C	T	V	X ₁₈	A	C	[45 - 76]		
RatS	G	C	G	E	G	G	C	G	A	C	T	V	X ₁₈	A	C	[41 - 72]		
MelS	G	C	A	E	G	G	C	G	A	C	T	V	X ₁₈	A	C	[46 - 77]		
ObsS	G	C	A	E	G	G	C	G	A	C	T	V	X ₁₈	A	C	[42 - 73]		
BomS	G	D	G	E	G	G	C	G	A	C	T	V	X ₁₈	A	C	[52 - 83]		
HuhS	G	C	G	E	G	G	C	G	A	C	T	V	X ₁₈	A	C	[46 - 77]		
CalS	G	C	G	E	G	G	C	G	A	C	T	V	X ₁₈	A	C	[55 - 86]		
AspS	G	C	A	E	G	G	C	G	A	C	T	V	X ₁₈	A	C	[72 - 102]		
MopS	G	C	E	Q	G	Q	C	G	A	C	S	V	X ₈	A	C	[39 - 60]		
IorS	G	C	G	L	G	L	C	G	A	C	T	V	X ₈	S	C	[38 - 59]		
CsoS	G	C	E	T	G	I	C	G	A	C	S	V	X ₈	S	C	[41 - 62]		
CopS	G	C	D	T	S	H	C	G	A	C	T	V	X ₈	S	C	[41 - 62]		
NdhS	G	C	E	H	G	V	C	G	A	C	T	I	X ₈	S	C	[47 - 68]		
CooS	G	C	D	T	S	II	C	G	A	C	T	V	X ₈	S	C	[41 - 62]		
QorS	G	C	E	Q	G	V	C	G	S	C	T	I	X ₈	S	C	[47 - 62]		

b)		★	↓	★	↓				★	★		★	+	↓	★	↓	+	+	★			
MenS	Q	C	G	F	C	T	P	G	X ₈	L	X ₁₇	-	-	N	L	C	R	C	T	G	Y	[112 - 153]
MauS	Q	C	G	F	C	T	P	G	X ₈	L	X ₁₇	-	-	N	L	C	R	C	T	G	Y	[114 - 155]
RatS	Q	C	G	F	C	T	P	G	X ₈	L	X ₁₇	-	-	N	L	C	R	C	T	G	Y	[110 - 151]
MelS	Q	C	G	F	C	T	P	G	X ₈	L	X ₁₇	-	-	N	L	C	R	C	T	G	Y	[116 - 157]
ObsS	Q	C	G	F	C	T	P	G	X ₈	L	X ₁₇	-	-	N	L	C	R	C	T	G	Y	[112 - 153]
BomS	Q	C	G	F	C	T	P	G	X ₈	L	X ₁₇	-	-	N	L	C	R	C	T	G	Y	[122 - 163]
HuhS	Q	C	G	F	C	T	P	G	X ₈	L	X ₁₇	-	-	N	L	C	R	C	T	G	Y	[116 - 157]
CalS	Q	C	G	F	C	T	P	G	X ₈	L	X ₁₇	-	-	N	L	C	R	C	T	G	Y	[125 - 166]
AspS	Q	C	G	F	C	T	P	G	X ₈	L	X ₁₇	-	-	N	L	C	R	C	T	G	Y	[141 - 182]
MopS	Q	C	G	F	C	S	P	G	X ₈	L	X ₁₇	H	R	N	A	C	R	C	T	G	Y	[99 - 142]
IorS	Q	C	G	Y	C	Q	S	G	X ₈	L	X ₁₇	-	-	N	L	C	R	C	G	T	Y	[96 - 137]
CsoS	Q	C	G	Y	C	T	P	G	X ₈	L	X ₁₇	-	-	N	L	C	R	C	T	G	Y	[100 - 141]
CopS	Q	C	G	F	C	T	P	G	X ₈	L	X ₁₇	-	-	N	L	C	R	C	T	G	Y	[100 - 141]
NdhS	Q	C	G	F	C	T	A	G	X ₈	L	X ₁₇	-	-	N	L	C	R	C	T	G	Y	[105 - 146]
CooS	Q	C	G	Y	C	T	P	G	X ₈	L	X ₁₇	-	-	N	L	C	R	C	T	G	Y	[101 - 142]
QorS	Q	C	G	F	C	T	A	G	X ₈	L	X ₁₇	-	-	N	L	C	R	C	T	G	Y	[106 - 147]

Abb. 4. Vergleich der Aminosäuresequenzen, die an der Bindung a) des N-terminalen Endes des [2Fe-2S]-Zentrums vom Ferredoxin-Typ und b) des internen [2Fe-2S]-Zentrums der molybdänhaltigen Hydroxylasen beteiligt sind.^[94] Die Zahlen am Ende jeder Reihe entsprechen der Zahl der Aminosäuren der entsprechenden Protein-Untereinheit oder -Domäne. Men = Xanthin-Dehydrogenase aus *Homo sapiens*, Mau = Xanthin-Dehydrogenase aus *Mus musculus*, Rat = Xanthin-Dehydrogenase aus *Rattus norvegicus*, Mel = Xanthin-Dehydrogenase aus *Drosophila melanogaster*, Obs = Xanthin-Dehydrogenase aus *Drosophila pseudoobscura*, Bom = Xanthin-Dehydrogenase aus *Bombyx mori*, Huh = Xanthin-Dehydrogenase aus *Gallus gallus*, Cal = Xanthin-Dehydrogenase aus *Calliphora vicina*, Asp = Xanthin-Dehydrogenase aus *Aspergillus nidulans*, Mop = Aldehyd-Oxidoreduktase aus *Desulfovibrio gigas*, Ior = Isochinolin-1-Oxidoreduktase aus *Brevundimonas diminuta* 7, Cso = Chinolindisäure-4-Oxidoreduktase aus *Pseudomonas* sp. AK-2, Cop = Kohlenmonoxid-Dehydrogenase aus *Pseudomonas thermocarboxydovorans* C2, Ndh = Nicotin-Dehydrogenase aus *Arthrobacter nicotinovorans*, Coo = Kohlenmonoxid-Dehydrogenase aus *Oligotropha carboxydovorans*, Qor = Chinolin-2-Oxidoreduktase aus *Pseudomonas putida* 86; S: kleine Untereinheit der entsprechenden Domäne; ↓: konservierte Cystein-Reste; ★: durchgehend konservierte Aminosäurereste; + in den meisten Sequenzen konservierte Aminosäurereste.

bei prokaryotischen molybdänhaltigen Hydroxylasen 11,^[53, 98] bei eukaryotischen Molybdänhydroxylasen 21 und bei Ferredoxinen vom bakteriellen oder vom Chloroplast-Typ 29, in Ausnahmefällen 27–32. Im Unterschied dazu wurde das Bindungsmotiv des internen [2Fe-2S]-Clusters, das bei den untersuchten kleinen Untereinheiten das streng konservative Motiv [CX₂CX₃₁CXC] bildet, bisher bei noch keinem anderen Eisen-Schwefel-Protein eu- und prokaryotischer Organismen beschrieben (Abb. 4b).

In Analogie zur mittleren Domäne oder Untereinheit der anderen bekannten molybdänhaltigen Hydroxylasen sollte die mittlere Untereinheit der Chinolin-2-Oxidoreduktase ebenfalls (QorM) die FAD-Bindungsstelle enthalten.^[53, 95, 96, 98, 100, 101] Aus der Literatur sind mehrere Dinucleotid-(FAD-, NAD-/NADP-, ADP-)Bindungsmotive be-

kannt.^[102] Zu allen FAD-Bindungsstellen gehören G-reiche Sequenzen, z. B. [GXGX₂GX₃A] oder [GXGX₂GX₃G]. Ein ähnliches Motiv, [GXGX₂AX₃A], ist der NAD-Bindungsstelle zuzuordnen. Weder diese noch andere bekannte Motive wurden in QorM oder in den Vergleichssequenzen von neun eukaryotischen Xanthin-Dehydrogenasen und fünf prokaryotischen molybdänhaltigen Hydroxylasen entdeckt.^[94] Auch der Peptid-Domäne, die den Flavin-Cofaktor der eukaryotischen Aldehyd-Oxidase binden soll, fehlt eine derartige Sequenz.^[103] Da Strukturdaten für die Bindung von FAD durch prokaryotische Molybdo-Eisen-Schwefel-Flavoproteine fehlen, ist noch immer nicht bekannt, wie FAD in dieser Unterklasse der „Xanthin-Oxidase-Familie“ gebunden wird.

Die großen Untereinheiten von Chinolin-2-Oxidoreduktase (QorL) und Isochinolin-1-Oxidoreduktase (IorB) enthalten wahrscheinlich den Molybdopterin-Cytosin-Dinucleotid-Cofaktor. QorL, IorB und andere große Untereinheiten oder entsprechende Domänen vieler molybdänhaltiger Enzyme weisen signifikante Homologien zur C-terminalen Domäne der Aldehyd-Oxidoreduktase aus *Desulfovibrio gigas* (siehe Abschnitt 4.1) auf. In der Domäne dieses Enzyms entdeckten Romão et al. drei Molybdopterin-bindende Aminosäuresegmente und zwei Dinucleotid-bindende Abschnitte.^[64] Tatsächlich finden sich in anderen molybdänhaltigen Enzymen der „Xanthin-Oxidase-Familie“ eng verwandte Signalsequenzen. Abbildung 5 zeigt den Vergleich der Sequenz der Molybdopterin- und Dinucleotid-bindenden Segmente aus Aldehyd-Oxidoreduktase mit der der entsprechenden Abschnitte anderer molybdänhaltiger Hydroxylasen. Das erste mit Molybdopterin verbundene Segment ist die am stärksten konservierte Sequenz der fünf Motive. In der Aldehyd-Oxidoreduktase aus *Desulfovibrio gigas* ist es über F421 und G422 mit Molybdopterin verbunden. Bei allen verglichenen Sequenzen erwies es sich als streng konservativ.

Die Aufklärung der Struktur und Funktion einzelner konservierter Peptid-Domänen von molybdänhaltigen Hydroxylasen erfordert weitere Untersuchungen. So ist die Rolle individueller Aminosäurereste durch gerichtete Mutagenese zu klären. Von großer Bedeutung wären auch Röntgenstrukturanalysen der kristallisierten Enzymproteine.

	★★★★★	★	★	★	★	★★★	★	★	★★
MenL	GGGF G G K	A F R	-	G F G G P Q W M	M G Q G	S P T A A S	V G E P P L		
MauL	GGGF G G K	A F R	-	G F G G P Q G M	M G Q G	S P T A A S	V G E P P L		
RatL	GGGF G G K	A F R	-	G F G G P Q G M	M G Q G	S P T A A S	V G E P P L		
MelL	GGGF G G K	A F R	-	G F G G P Q G M	I G Q G	S P T A A S	V G E P P L		
ObsL	GGGF G G K	A F R	-	G F G G P Q G M	I G Q G	S P T A A S	V G E P P L		
BomL	GGGF G G K	A F R	-	G F G A P Q V M	M G Q G	T A T A A S	I G E P P L		
HuhL	GGGF G G K	A F R	-	G F G G P Q G M	M G Q G	S P T A A S	V G E P P L		
CalL	GGGF G G K	A F R	-	G F G G P Q G M	I G Q G	S P T A A S	V G E P P L		
AspL	GGGF G G K	A F R	-	G F G G P Q G L	M G Q G	S S T A A S	V G E P P L		
MopL	G G T F G Y K	A F R	-	G Y G A P Q S M	H G Q G	G P S G G S	V G E L P L		
CsoL	GGGF G N K	V A Y R C S F R V T E A V		Q G Q G	L G T Y G S	V G E S P H			
CooL	GGGF G N K	V A Y R C S F R V T E A V		Q G Q G	L G T Y G S	V A E S P P			
NdhL	GGGF G Q K	A F R	-	G V G Y T A G T	Q G Q G	S G T I G S	M G E S G L		
QorL	GGGF G Q K	A Y R	-	G V G F T A G Q	S G Q G	F G A Y A S	M G E S A M		
	MoCoI	MoCoII		MoCoIII	MoCoIV	MoCoV			

Abb. 5. Vergleich der vermutlich an der Bindung des Pterin-Molybdän-Cofaktors molybdänhaltiger Hydroxylasen beteiligten Aminosäuresequenzen.^[64, 94] MoCoI, MoCoII, MoCoIII: mutmaßliche Bereiche der Molybdopterin-Bindung. MoCoIV, MoCoV: mutmaßliche Bereiche der Dinucleotid-Bindung.^[64] für andere Abkürzungen und Symbole siehe Abb. 4. L ist die große Untereinheit oder entsprechende Domäne.

5. Zukunftsaussichten: Biotransformationen mit molybdänhaltigen Hydroxylasen

Bei der Herstellung wertvoller Zwischenprodukte für Synthesen von Agrochemikalien und pharmazeutischen Produkten könnten Biotransformationen mit Mikroorganismen oder Biokatalysatoren eine vielseitige und ökonomisch interessante Alternative zu konventionellen Methoden der Chemie sein. Chemische Synthesen wie Hydroxylierungen von Arenen und Heteroarenen benötigen im allgemeinen drastische Bedingungen; zudem kann die Abtrennung und Entsorgung der Nebenprodukte teuer sein, und oft bleiben die Ausbeuten hinter den Erwartungen zurück. Dagegen sind Biokatalysatoren in der Regel substrat- und regiospezifisch, so daß definierte Produkte entstehen, die mit konventionellen Methoden nur unter Schwierigkeiten erhältlich sind.

Eine Reihe hydroxylierter Chinoline, Isochinoline und Benzodiazine ist bei der Herstellung von Pharmazeutika und Agrochemikalien von Bedeutung:

- 1) Isocarbostyryle und Carbostyryle: 2H-1-Oxoisoquinolin (Isocarbostyryl) wird chemisch durch Einwirken einer KOH-NaOH- oder KOH-Na₂O-Schmelze auf Isochinolin synthetisiert.^[104] Andere Herstellungsmöglichkeiten für 2H-1-Oxoisoquinoline sind die Pd-katalysierte Substitution von 2-Brombenzamidinen mit Ethylen und die nachfolgende Cyclisierung des entstandenen 2-Ethenylbenzamidins^[105] oder die Synthese aus N-Propenyl-2-methylbenzamid.^[106] Derivate von 2H-1-Oxoisoquinolin werden häufig als Medikamente, Duftstoffe, Pharmazeutika und Agrochemikalien verwendet.
- 2) 1H-2-Oxochinolin (Carbostyryl) **12** wird analog hergestellt. So kann es aus Chinolin **10** in einer KOH-Na₂O- oder KOH-NaOH-Schmelze^[104] und auf anderen bekannten Synthesewegen erhalten werden. Carbostyrylderivate sind nützlich als Gerinnungshemmer,^[107] Kardiotonika^[108] und Neuroleptika.^[109] Eine Reihe von 6-substituierten Carbostyrylen hemmt die Phosphodiesterasen der glatten Gefäßmuskulatur, die cAMP und cGMP hydrolytisch spalten. Sie könnten daher zur Behandlung z. B. kardiovaskulärer Erkrankungen eingesetzt werden.^[110] Procaterol (8-Hydroxy-5-[1-hydroxy-2-(isopropylamino)butyl]-2(1H)-chinolinon) ist ein als Bronchodilatator wirksames sympathomimetisches Amin.^[111]
- 3) Chinolone, vor allem 6-Fluorchinolone, haben große Bedeutung; es sind Tausende von Fluorchinolone-Analoga bekannt. Sie wirken bakterizid gegen Gram-negative und Gram-positive pathogene Bakterien, aber auch gegen Mykobakterien und andere intrazelluläre Bakterien. Außerdem wirken sie gegen einige Protozoen wie *Leishmania*-, *Trypanosoma*- und *Plasmodium*-Spezies, so daß sie für die Malaria-Therapie von Nutzen sein könnten.^[11-13, 112]
- 4) Hydroxylierte Benzodiazine (Chinoxalone, Phthalazone, Chinazolone): Es

gibt zahlreiche Patente zu chemischen Synthesemethoden für 1*H*-2-Oxochinoxalin **43**, das als Zwischenprodukt zur Herstellung von Agrochemikalien, Medikamenten und Farben benötigt wird. Das Pestizid Chinalphos (*O,O*-Diethyl-*O*-chinoxalin-2-yl-phosphorthioat), ein Organophosphat, wird häufig in Kulturen tropischer, subtropischer und gemäßigter Zonen angewendet, z.B. bei Zitronenbäumen gegen den Käfer *Nipaecoccus vastor*.^[113] Einige 1*H*-2-Oxochinoxalin-Derivate wirken gegen entzündliche und allergische Erkrankungen: So dient 1,3-Dimethyl-1*H*-2-oxochinoxalin als Bronchodilatator bei der Behandlung von Asthma.^[114]

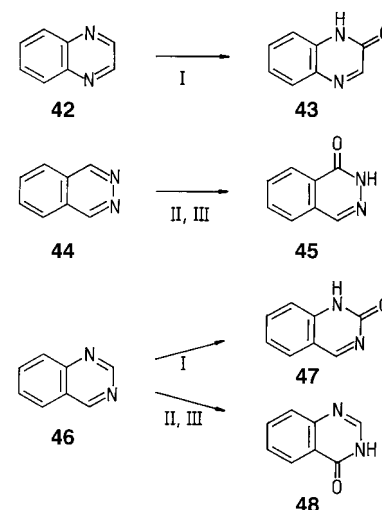
- 5) Zur chemischen Synthese von 2*H*-1-Oxophthalazin **45** gibt es ebenfalls zahlreiche Patente. Substituierte (2-Biphenyl)-2*H*-1-oxophthalazine sind als Beruhigungsmittel und Antidepressiva gebräuchlich, aber auch entzündliche Krankheiten werden mit diesen Verbindungen behandelt.^[115] Einige 2*H*-1-Oxophthalazin-Derivate sind gefäßaktive Wirkstoffe, die die Thrombocytenaggregation inhibieren.^[116] Ferner werden Oxophthalazine bei der Herstellung photothermographischer Filme eingesetzt.^[117]
- 6) Auch Derivate von Chinazolin, vor allem von 3*H*-4-Oxochinazolin **48**, werden für die Produktion von Pharmazeutika wie Antihypertensiva, Bronchodilatoren und Wirkstoffen, die entzündungshemmend sind oder das Zentralnervensystem beruhigen, gebraucht.^[118] Eine Übersicht über biologisch aktive Chinazolone, ihre Wirkung auf Würmer, Mikroben, Entzündungen, Tumore, das Zentralnervensystem und das kardiovaskuläre System geben Sinha und Srivastava.^[119]

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Wirkstoffe auf Carbostyryl-, Phthalazon-, Chinazolin- und Chinoxalobasis häufig als Entzündungshemmer, bei Herz-Kranzgefäßerkrankungen, zur Behandlung von Allergien und zur Beruhigung des Zentralnervensystems angewendet werden. Die Fluorchinolone bilden eine große Gruppe vielversprechender antibakterieller Wirkstoffe. Die hier beschriebenen hydroxylierten N-heterocyclischen Verbindungen werden bis heute fast ausschließlich durch chemische Synthesen erhalten. Biotechnische Synthesen, z.B. die in Japan patentierte Herstellung von Carbostyryl **12** und/oder 6-Hydroxycarbostyryl mit einem *Pseudomonas*-Stamm, sind bisher kaum etabliert,^[120] obwohl die alternative Synthese hydroxylierter Chinoline, Isochinoline und Benzodiazine durch Biotransformationen substrat- und regiospezifische Hydroxylierungen ohne Nebenprodukte ermöglicht. Dabei könnten die molybdänhaltigen Hydroxylasen als Biokatalysatoren eingesetzt werden. Da bei vielen Bakterien während des Wachstums auf einem Chinolinderivat die Oxoverbindungen in der Fermentationsbrühe akkumulieren (siehe Abschnitt 2.1), sind sogar Biotransformationen mit ganzen Zellen des entsprechenden N-Heterocyclen-abbauenden Stammes denkbar. Beispielsweise produzieren die Zellen von *Pseudomonas putida* 86 während des Wachstums auf Chinolin **10** 1*H*-2-Oxochinolin **12**. Hohe Chinolinkonzentrationen verhindern, daß das Produkt **12** weiter abgebaut wird. Dieses kann sogar in kristalliner Form aus der Kulturbrühe erhalten werden, indem man während der Fermentation die Konzentration des Substrats **10** entsprechend reguliert. Sie ist zunächst niedrig, um unter vollständigem

Substratverbrauch Biomasse zu produzieren, und wird dann erhöht und auf diesem hohen Niveau gehalten, so daß **12** akkumuliert und schließlich ausfällt.

Eine effiziente Methode zur Herstellung hydroxylierter Chinoline und Benzodiazine ist auch die Biotransformation in cometabolischen Reaktionen. Der Chinaldin-abbauende Stamm *Arthrobacter* sp. Rü61a wächst z.B. nicht auf Chinolin **10**. Werden hingegen Zellen dieses Stammes auf der Kohlenstoffquelle Chinaldin **1** vorgezchtet, um Biomasse zu produzieren und die 4-Hydroxylase zu induzieren, und wird anschließend Chinolin **10** angeboten, so entsteht wegen der breiten Substratspezifität von Chinaldin-4-Oxidase 1*H*-4-Oxochinolin **7** aus **10**, frei von Nebenprodukten und in hervorragender Ausbeute.

Auch isolierte Enzyme können als Katalysatoren dienen. Die am bakteriellen Abbau einer Reihe von N-Heterocyclen beteiligten molybdänhaltigen Hydroxylasen bieten mehrere Anwendungsmöglichkeiten: Isochinolin-1-Oxidoreduktase, Chinolin-2-Oxidoreduktase und Chinaldin-4-Oxidase akzeptieren als Substrate außer den Chinolinen auch einige Benzodiazine, wobei verschiedene Hydroxylierungsprodukte erhalten werden (Schema 14).^[72] Chinoxalin **42** wird von der



Schema 14. Durch molybdänhaltige Hydroxylasen katalysierte Hydroxylierung von Benzodiazinen.^[72] I: Chinolin-2-Oxidoreduktase aus *Pseudomonas putida* 86. II: Isochinolin-1-Oxidoreduktase aus *Brevundimonas diminuta* 7. III: Chinaldin-4-Oxidase aus *Arthrobacter* sp. Rü61a.

Chinolin-2-Oxidoreduktase aus *Pseudomonas putida* 86 zu 1*H*-2-Oxochinoxalin **43** umgesetzt. Die Isochinolin-1-Oxidoreduktase aus *Brevundimonas diminuta* 7 und die Chinaldin-4-Oxidase aus *Arthrobacter* sp. Rü61a überführen Phthalazin **44** in 2*H*-1-Oxophthalazin **45**. Chinazolin **46** schließlich wird durch die Isochinolin-1-Oxidoreduktase und Chinaldin-Oxidase an C4 und durch Chinolin-2-Oxidoreduktase an C2 hydroxyliert.^[72]

Vermutlich werden Organiker aber zögern, mit einem biologischen System zu arbeiten und ein Syntheseproblem biochemisch zu lösen. Im günstigsten Fall sorgt die Chemie für billige Vorstufen und die optimale Isolierung des Produkts, während der kritische Schritt von einem Enzym (oder einer Enzymmischung) oder aber von ganzen Zellen katalysiert

wird. Werden ganze Zellen benötigt, muß das Wachstum und die Stammhaltung der Bakterien im Fermentationssystem etabliert werden, die Bedingungen für die Biotransformation müssen optimiert sein, und schließlich muß das Produkt der Biotransformation von der Kulturbrühe abgetrennt werden. Dagegen können isolierte Enzyme, die entweder in roher oder in gereinigter Form, als lösliches Produkt oder in immobilisiertem Zustand, zur Verfügung stehen, wie ein chemischer Katalysator gehandhabt werden. Dennoch gibt es einige Anwendungen der Biotransformation mit ganzen Zellen, z.B. bei einem Prozeß der LONZA AG, bei dem 6-Hydroxynicotinsäure durch regiospezifische Hydroxylierung von Nicotinsäure mit einem natürlich vorkommenden Nicotinsäure-abbauenden Bakterium produziert wird.^[121] Das bakterielle Enzym, das Nicotinsäure hydroxyliert, ist ebenfalls eine molybdänhaltige Hydroxylase.

Die eher traditionellen Methoden der Biotransformation mit ganzen Zellsystemen oder isolierten Biokatalysatoren werden durch moderne Methoden der Molekularbiologie wie Klonieren mit (heterologer) Expression des entsprechenden „Hydroxylase“-Gens und Überproduktion des jeweiligen Enzyms ergänzt. Diese Methoden werden sicher dazu beitragen, daß Biotechnologie und Chemie in Zukunft eng zusammenarbeiten werden.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Der Stoffwechsel von Mikroorganismen, die in erster Linie für den Kreislauf organischer Verbindungen in der Biosphäre verantwortlich sind, ist sehr vielfältig. Die Wege, die Bakterien zur Metabolisierung der verschiedenen Klassen organischer Verbindungen nutzen, wurden und werden von zahlreichen Arbeitsgruppen eingehend untersucht. Organische Substanzen können biologisch bis zur Mineralisation abgebaut werden. Eine andere Möglichkeit ist die Biotransformation, bei der die Grundstruktur der Verbindungen im Prinzip erhalten bleibt. Durch Mineralisation einer organischen Verbindung wird Kohlenstoff und Energie für das mikrobielle Wachstum bereitgestellt. Bei cometabolischen Vorgängen setzen Mikroorganismen in Gegenwart eines für ihr Wachstum essentiellen Substrats ein anderes, für ihr Wachstum nicht nutzbares Substrat um. Cometabolismus scheint bei Biotransformationen und Abbauprozessen organischer Materie eine bedeutende Rolle zu spielen. Daher ist anzunehmen, daß auch die N-Heterocyclen in der Natur cometabolisch umgesetzt werden. Alle in diesem Aufsatz genannten Bakterienstämme wurden aus Erd- und Wasserproben angereichert und isoliert, indem ihnen ein Chinolin als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle angeboten wurde. Auf diese Weise wurden Stämme selektiert, die auf diesen Verbindungen wachsen konnten.

Bei Untersuchungen an den so isolierten Bakterien wurden vier aerobe Abbauprozesse für Chinolinderivate gefunden. In einigen Fällen traten geringe Mengen an Nebenprodukten (wahrscheinlich Produkte einer „Sackgasse“ im Metabolismus) in der Kulturbrühe auf, im allgemeinen verlief der Abbau aber bis zur vollständigen Mineralisation. Bakterien haben also mehrere effiziente Strategien entwickelt, um diese

N-Heterocyclen zu metabolisieren. Viele Abbauschritte sind aber noch nicht detailliert verstanden.

Alle in einem Organismus ablaufenden biochemischen Reaktionen werden von Enzymen gesteuert, die in der Mehrzahl ausgesprochen selektiv sind. Enzyme arbeiten prinzipiell – je nach katalysierter Reaktion – chemoselektiv, regio- und stereoselektiv sowie enantioselektiv. Bei umfassenden Studien zum bakteriellen Abbau von Chinolin und seinen Derivaten wurde eine Reihe interessanter Enzyme gefunden, z.B. die molybdänhaltigen Hydroxylasen, die regiospezifische Hydroxylierungen ihrer(r)s jeweiligen N-heteroaromatischen Substrate(s) katalysieren. Darüber hinaus wurden ungewöhnliche 2,4-Dioxygenasen entdeckt, die unter Bildung von Kohlenmonoxid die Spaltung zweier C-C-Bindungen katalysieren. Auch wenn über die Katalysatoren des aeroben Abbaus N-heterocyclischer Verbindungen bereits einiges bekannt ist, sind vor allem hinsichtlich des Mechanismus enzymkatalysierter Reaktionen noch viele Fragen offen. Daher wurde das auf physiologischer und biochemischer Ebene begonnene Studium der bakteriellen Enzyme durch biophysikalische Methoden wesentlich erweitert, so daß ein tieferer Einblick in die Funktionsweise der redoxaktiven Zentren und Cofaktoren möglich wurde. Die Kristallisation von Enzymproteinen und ihre genetische Analyse sollen dazu dienen, Strukturdaten mit Hilfe von Röntgenbeugungsmustern zu erhalten und die für katabolische Enzyme kodierenden Gene zu identifizieren. Die zukünftige Forschung sollte sich außerdem auf Regulationsmechanismen richten, die die Abbauprozesse steuern. Dadurch wird es vielleicht möglich, Stoffwechselprozesse auf molekularer Ebene zu verstehen und eine Vorstellung über die Evolution von „Enzymfamilien“ zu entwickeln. Ein praktischer Gesichtspunkt bei der Erforschung von Katalysezyklen und Regulationsmechanismen der Enzymsynthese und/-aktivität ist die Abschätzung des Potentials von Biokatalysatoren – ganzer Zellsysteme oder isolierter Enzyme – für den Einsatz in biotechnologischen Prozessen.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für die finanzielle Unterstützung. Für die hervorragende Zusammenarbeit sind wir Herrn Dr. G. Collin und Herrn Dr. H. Höke, früher Rütgerswerke AG, zu Dank verpflichtet.

Eingegangen am 30. September 1996,
veränderte Fassung am 14. April 1997 [A 191]
Übersetzt von Dr. Barbara Tshisuaka, Stuttgart

- [1] D. Warshawsky, *Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* **1992**, C10, 1–71.
- [2] D. L. Vassilaros, P. W. Stoker, G. M. Booth, M. L. Lee, *Anal. Chem.* **1982**, 54, 106–112.
- [3] R. C. Barrick, E. T. Furlong, R. Carpenter, *Environ. Sci. Technol.* **1984**, 18, 846–854.
- [4] J. Santodonato, P. H. Howard in *Hazard Assessment of Chemicals, Vol. 1* (Hrsg.: J. Saxena, F. Fisher), Academic Press, New York, **1981**, S. 421–439.
- [5] W. E. Pereira, C. E. Rostad, J. R. Garbarino, M. F. Hult, *Environ. Toxicol. Chem.* **1983**, 2, 283–294; W. E. Pereira, C. E. Rostad, D. M. Updegraff, J. L. Bennett, *ibid.* **1987**, 6, 163–176; D. H. Stuermer, D. J.

- Ng, C. J. Morris, *Environ. Sci. Technol.* **1982**, *16*, 582–587; J. G. Mueller, P. J. Chapman, P. H. Pritchard, *ibid.* **1989**, *23*, 1197–1201; M. G. Ondrus, T. R. Steinheimer, *J. Chromatogr. Sci.* **1990**, *28*, 324–330.
- [6] K. Hirao, Y. Shinohara, H. Tsuda, S. Fukushima, M. Takahashi, N. Ito, *Cancer Res.* **1976**, *36*, 329–335.; E. J. LaVoie, S. Dolan, P. Little, C.-X. Wang, S. Sugie, A. Rivenson, *Food Chem. Toxicol.* **1988**, *26*, 625–629.
- [7] M. Nagao, T. Yahagi, Y. Seino, T. Sugimura, N. Ito, *Mutat. Res.* **1977**, *42*, 335–342.
- [8] T. Sugimura, *Mutat. Res.* **1988**, *205*, 33–39.
- [9] H. E. Kaeser, R. Wüthrich, *Dtsch. Med. Wochenschr.* **1970**, *95*, 1685–1688; Anonymus, *Naturwiss. Rundsch.* **1971**, *24*, 492; H.-H. Vogt, *Chem. Labor Betr.* **1979**, *30*, 296–297.
- [10] M. Sainsbury in *Rodd's Chemistry of Carbon Compounds, Vol. IV, Part G*, (Hrsg.: S. Coffey), Elsevier, Amsterdam, **1978**, S. 171–255; M. Sainsbury in *Rodd's Chemistry of Carbon Compounds, Suppl. Vol. IV, Part G*, (Hrsg.: M. F. Ansell), Elsevier, Amsterdam, **1987**, S. 209–244.
- [11] M. Neuman, A. Esanu, *Drugs Exp. Clin. Res.* **1988**, *14*, 385–391.
- [12] A. Bryskier, *Int. J. Antimicrob. Agents* **1993**, *2*, 151–184.
- [13] Y. X. Furet, J. C. Pechère, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1991**, *10*, 249–254.
- [14] G. T. Keusch, *Rev. Infect. Dis.* **1988**, *10*, S199–S205.
- [15] G. Collin, H. Höke in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A22*, VCH, Weinheim, **1993**, S. 465–469.
- [16] D. Hutzler, I. Pevny, *Dermatosen* **1988**, *36*, 86–90; I. Pevny, D. Hutzler, *ibid.* **1988**, *36*, 91–98.
- [17] a) J. Liebig, *Justus Liebig's Ann. Chem.* **1853**, *86*, 125; b) A. Butenandt, P. Karlson, W. Zillig, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1951**, *288*, 125–129.
- [18] M. Luckner in *Biosynthese der Alkaloide* (Hrsg.: K. Mothes, H. R. Schütte), VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, **1969**, S. 510–550; C. Ritter, M. Luckner, *Eur. J. Biochem.* **1971**, *18*, 391–400.
- [19] G. Schwarz, F. Lingens in *Biochemistry of Microbial Degradation* (Hrsg.: C. Ratledge), Kluwer, Dordrecht, **1994**, S. 459–486.
- [20] G. Schwarz, E. Senghas, A. Erben, B. Schäfer, F. Lingens, H. Höke, *Syst. Appl. Microbiol.* **1988**, *10*, 185–190.
- [21] G. Schwarz, R. Bauder, M. Speer, T. O. Rommel, F. Lingens, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1989**, *370*, 1183–1189.
- [22] H.-K. Hund, A. de Beyer, F. Lingens, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1990**, *371*, 1005–1008.
- [23] G. Bott, M. Schmidt, T. O. Rommel, F. Lingens, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1990**, *371*, 999–1003.
- [24] S. Schach, G. Schwarz, S. Fetzner, F. Lingens, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1993**, *374*, 175–181.
- [25] S. Schach, B. Tshisuaka, S. Fetzner, F. Lingens, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *232*, 536–544.
- [26] A. Rüger, G. Schwarz, F. Lingens, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1993**, *374*, 479–488.
- [27] D. J. W. Grant, T. R. Al-Najjar, *Microbios* **1976**, *15*, 177–189.
- [28] O. P. Shukla, *Biol. Mem.* **1987**, *13*, 115–131.
- [29] T. R. Al-Najjar, R. J. Grout, D. J. W. Grant, *Microbios Lett.* **1976**, *1*, 157–163.
- [30] H. Taniuchi, O. Hayaishi, *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 283–293.
- [31] S. Dagley, P. A. Johnson, *Biochim. Biophys. Acta* **1963**, *78*, 577–587.
- [32] O. P. Shukla, *Appl. Environ. Microbiol.* **1986**, *51*, 1332–1342; O. P. Shukla, *Microbios* **1989**, *59*, 47–63.
- [33] B. Rosche, B. Tshisuaka, S. Fetzner, F. Lingens, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 17836–17842; B. Rosche, S. Fetzner, F. Lingens, W. Nitschke, A. Riedel, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1252*, 177–179; B. Rosche, B. Tshisuaka, B. Hauer, F. Lingens, S. Fetzner, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 3549–3554.
- [34] F. S. Sariaslani, *Crit. Rev. Biotechnol.* **1989**, *9*, 171–257, zit. Lit.
- [35] A. E. True, A. M. Orville, L. L. Pearce, J. D. Lipscomb, L. Que, Jr., *Biochemistry* **1990**, *29*, 10847–10854, zit. Lit.; I. Bertini, F. Briganti, S. Mangani, H. F. Nolting, A. Scozzafava, *ibid.* **1994**, *33*, 10777–10784, zit. Lit.; D. M. Arciero, J. D. Lipscomb, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 2170–2178, zit. Lit.; M. R. Harpel, J. D. Lipscomb, *ibid.* **1990**, *265*, 6301–6311, 22187–22196; C. Nakai, K. Horiike, S. Kuramitsu, H. Kagamiyama, M. Nozaki, *ibid.* **1990**, *265*, 660–665, zit. Lit.; S. A. Wolgel, J. E. Dege, P. E. Perkins-Olson, C. H. Juarez-Garcia, R. L. Crawford, E. Münck, J. D. Lipscomb, *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 4414–4426, zit. Lit.
- [36] L. G. Sparrow, P. P. K. Ho, T. K. Sundaram, D. Zach, E. J. Nyns, E. E. Snell, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 2590–2600.
- [37] G. K. Watson, C. Houghton, R. B. Cain, *Biochem. J.* **1974**, *140*, 277–292.
- [38] E. J. Behrman, R. Y. Stanier, *J. Biol. Chem.* **1957**, *228*, 923–945; J. J. Gauthier, S. C. Rittenberg, *ibid.* **1971**, *246*, 3737–3742, 3743–3748; C. G. Orpin, M. Knight, W. C. Evans, *Biochem. J.* **1972**, *127*, 819–831; R. B. Cain, C. Houghton, K. A. Wright, *ibid.* **1974**, *140*, 293–300.
- [39] R. Tenhunen, H. S. Marver, R. Schmid, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 6388–6394; M. D. Maines, *FASEB J.* **1988**, *2*, 2557–2568.
- [40] T. Oka, F. J. Simpson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1971**, *43*, 1–5.
- [41] H. G. Krishnamurty, F. J. Simpson, *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 1467–1471; T. Oka, F. J. Simpson, J. J. Child, S. C. Mills, *Can. J. Microbiol.* **1971**, *17*, 111–118; T. Oka, F. J. Simpson, H. G. Krishnamurty, *ibid.* **1972**, *18*, 493–508.
- [42] J. W. Wray, R. H. Abeles, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 21466–21469.
- [43] J. W. Wray, R. H. Abeles, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 3147–3153.
- [44] I. Bauer, A. de Beyer, B. Tshisuaka, S. Fetzner, F. Lingens, *FEMS Microbiol. Lett.* **1994**, *117*, 299–304.
- [45] I. Bauer, N. Max, S. Fetzner, F. Lingens, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *240*, 576–583.
- [46] G. Speier in *Dioxygen Activation and Homogeneous Catalytic Oxidation* (Hrsg.: L. I. Simándi), Elsevier, Amsterdam, **1991**, S. 269–278.
- [47] A. Nishinaga, T. Tojo, H. Tomita, T. Matsuura, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1979**, 2511–2516.
- [48] A. Nishinaga, T. Tojo, T. Matsuura, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1974**, 896–897.
- [49] G. A. Russell, *Pure Appl. Chem.* **1967**, *15*, 185–206.
- [50] A. Nishinaga, T. Shimizu, T. Matsuura, *Chem. Lett.* **1977**, 547–550.
- [51] a) *Molybdenum Enzymes, Cofactors, and Model Systems* (Hrsg.: E. I. Stiefel, D. Coucouvanis, W. E. Newton), American Chemical Society, Washington, DC, **1993**; b) B. K. Burgess in Lit.^[51a], S. 144–169; c) D. C. Rees, J. Kim, M. M. Georgiadis, H. Komiya, A. J. Chirino, D. Woo, J. Schlessman, M. K. Chan, L. Joshua-Tor, G. Santillan, P. Chakrabarti, B. T. Hsu in Lit.^[51a], S. 170–185; d) J. W. Peters, K. Fisher, D. R. Dean, *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, *49*, 335–366; e) A. Müller, E. Krahn, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1172–1179; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1071–1078.
- [52] R. C. Bray, *Q. Rev. Biophys.* **1988**, *21*, 299–329.
- [53] J. C. Wootton, R. E. Nicolson, J. M. Cock, D. E. Walters, J. F. Burke, W. A. Doyle, R. C. Bray, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1057*, 157–185.
- [54] R. S. Pilato, E. I. Stiefel in *Bioinorganic Catalysis* (Hrsg.: J. Reedijk), Dekker, New York, **1993**, S. 131–188.
- [55] R. Hille in Lit.^[51a], S. 22–37; *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1184*, 143–169; R. Hille, T. Nishino, *FASEB J.* **1995**, *9*, 995–1003; R. Hille, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2757–2816.
- [56] W. Koschara, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1940**, *263*, 78–79.
- [57] M. Goto, A. Sakurai, K. Ohta, H. Yamakami, *J. Biochem.* **1969**, *65*, 611–620.
- [58] J. L. Johnson, K. V. Rajagopalan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 6856–6860.
- [59] K. V. Rajagopalan, J. L. Johnson, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 10199–10202; K. V. Rajagopalan in Lit.^[51a], S. 38–49.
- [60] J. L. Johnson, N. R. Bastian, K. V. Rajagopalan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 3190–3194.
- [61] J. L. Johnson, K. V. Rajagopalan, O. Meyer, *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, *283*, 542–545.
- [62] G. Börner, M. Karrasch, R. K. Thauer, *FEBS Lett.* **1991**, *290*, 31–34.
- [63] M. K. Chan, S. Mukund, A. Kletzin, M. W. W. Adams, D. C. Rees, *Science* **1995**, *267*, 1463–1469.
- [64] M. J. Romão, M. Archer, I. Moura, J. J. G. Moura, J. LeGall, R. Engh, M. Schneider, P. Hof, R. Huber, *Science* **1995**, *270*, 1170–1176; M. J. Romão, R. Huber, *Struct. Bonding (Berlin)* **1998**, *90*, 69–95.
- [65] H. Schindelin, C. Kisker, J. Hilton, K. V. Rajagopalan, D. C. Rees, *Science* **1996**, *272*, 1615–1621; F. Schneider, J. Löwe, R. Huber, H. Schindelin, C. Kisker, J. Knäblein, *J. Mol. Biol.* **1996**, *263*, 53–69.
- [66] B. D. Howes, R. C. Bray, R. L. Richards, N. A. Turner, B. Bennett, D. J. Lowe, *Biochemistry* **1996**, *35*, 1432–1443; R. Huber, P. Hof,

- R. O. Duarte, J. J. G. Moura, I. Moura, M.-Y. Liu, J. LeGall, R. Hille, M. Archer, M. J. Romão, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 8846–8851.
- [67] V. N. Gladyshev, S. V. Khangulov, T. C. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 232–236; V. N. Gladyshev, S. V. Khangulov, T. C. Stadtman, *Biochemistry* **1996**, *35*, 212–223.
- [68] V. N. Gladyshev, S. V. Khangulov, M. J. Axley, T. C. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 7708–7711.
- [69] D. Hettrich, B. Peschke, B. Tshisuaka, F. Lingens, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1991**, *372*, 513–517.
- [70] B. Peschke, F. Lingens, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1991**, *372*, 1081–1088.
- [71] A. de Beyer, F. Lingens, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1993**, *374*, 101–110.
- [72] I. Stephan, B. Tshisuaka, S. Fetzner, F. Lingens, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *236*, 155–162.
- [73] G. Bauer, F. Lingens, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1992**, *373*, 699–705.
- [74] M. Sauter, B. Tshisuaka, S. Fetzner, F. Lingens, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1993**, *374*, 1037–1046.
- [75] M. Lehmann, B. Tshisuaka, S. Fetzner, P. Röger, F. Lingens, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 11254–11260.
- [76] R. Bauder, B. Tshisuaka, F. Lingens, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1990**, *371*, 1137–1144.
- [77] T. A. Krenitzky, S. M. Neil, G. B. Elion, G. H. Hitchings, *Arch. Biochem. Biophys.* **1972**, *150*, 585–599.
- [78] D. Hettrich, F. Lingens, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1991**, *372*, 203–211.
- [79] B. Tshisuaka, R. Kappl, J. Hüttermann, F. Lingens, *Biochemistry* **1993**, *32*, 12928–12934.
- [80] P. Röger, A. Erben, F. Lingens, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1990**, *371*, 511–513; J. Aislabie, S. Rothenburger, R. M. Atlas, *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, *55*, 3247–3249; J. Aislabie, N. K. Richards, T. C. Lytle, *Can. J. Microbiol.* **1994**, *40*, 555–560; O. P. Shukla, *Microbios Lett.* **1990**, *45*, 89–96.
- [81] P. Röger, G. Bär, F. Lingens, *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, *129*, 281–286.
- [82] S. Fetzner, F. Lingens, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1993**, *374*, 363–376.
- [83] Q. Xiang, D. E. Edmondson, *Biochemistry* **1996**, *35*, 5441–5450.
- [84] M. Nagel, J. R. Andreesen, *Arch. Microbiol.* **1990**, *154*, 605–613.
- [85] A. Kretzer, K. Frunzke, J. R. Andreesen, *J. Gen. Microbiol.* **1993**, *139*, 2763–2772.
- [86] W. Freudenberg, K. König, J. R. Andreesen, *FEMS Microbiol. Lett.* **1988**, *52*, 13–18.
- [87] B. Bubeck, B. Tshisuaka, S. Fetzner, F. Lingens, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1293*, 39–44.
- [88] M. P. Coughlan in *Molybdenum and Molybdenum-Containing Enzymes* (Hrsg.: M. P. Coughlan), Pergamon, Oxford, **1980**, S. 119–185.
- [89] C. Beedham, *Drug Metab. Rev.* **1985**, *16*, 119–156, zit. Lit.
- [90] M. Lehmann, B. Tshisuaka, S. Fetzner, F. Lingens, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 14420–14429.
- [91] G. Palmer, F. Müller, V. Massey in *Flavins and Flavoproteins* (Hrsg.: H. Kamin), University Park Press, Baltimore, **1971**, S. 123–140.
- [92] R. C. Bray in *The Enzymes* (Hrsg.: P. D. Boyer), Academic Press, New York, **1975**, S. 300–419.
- [93] R. C. Bray, N. A. Turner, J. LeGall, B. A. S. Barata, J. J. G. Moura, *Biochem. J.* **1991**, *280*, 817–820.
- [94] M. Bläse, C. Bruntner, B. Tshisuaka, S. Fetzner, F. Lingens, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23068–23079.
- [95] S. Grether-Beck, G. L. Igloi, S. Pust, E. Schilz, K. Decker, R. Brandsch, *Mol. Microbiol.* **1994**, *13*, 929–936.
- [96] D. M. Pearson, C. O'Reilly, J. Colby, G. W. Black, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1188*, 432–438.
- [97] U. Thoenes, O. L. Flores, A. Neves, B. Devreese, J. J. van Beeumen, R. Huber, M. J. Romão, J. LeGall, J. J. G. Moura, C. Rodrigues-Pousada, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *220*, 901–910.
- [98] A. Glatigny, C. Scazzocchio, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 3534–3550.
- [99] R. K. Hughes, B. Bennett, R. C. Bray, *Biochemistry* **1992**, *31*, 3073–3083.
- [100] R. K. Hughes, W. A. Doyle, A. Chovnick, J. R. S. Whittle, J. F. Burke, R. C. Bray, *Biochem. J.* **1992**, *285*, 507–513.
- [101] Y. Amaya, K. Yamazaki, M. Sato, K. Noda, T. Nishino, T. Nishino, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 14170–14175.
- [102] D. W. Rice, G. E. Schulz, J. R. Guest, *J. Mol. Biol.* **1984**, *174*, 483–496; R. K. Wierenga, P. Terpstra, W. G. J. Hol, *ibid.* **1986**, *187*, 101–107; G. Eggink, H. Engel, G. Vriend, P. Terpstra, B. Witholt, *ibid.* **1990**, *212*, 135–142; I. Hanukoglu, T. Gutfinger, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *180*, 479–484; C. C. Correll, M. L. Ludwig, C. M. Bruns, P. A. Karplus, *Protein Sci.* **1993**, *2*, 2112–2133.
- [103] M. Li Calzi, C. Raviolo, E. Ghibaudi, L. De Gioia, M. Salmons, G. Cazzaniga, M. Kurosaki, M. Terao, E. Garattini, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 31037–31045; R. M. Wright, G. M. Vaitaitis, C. M. Wilson, T. B. Repine, L. S. Terada, J. E. Repine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10690–10694.
- [104] J. J. M. Vandewalle, E. De Ruiter, H. Reimlinger, R. A. Lenaers, *Chem. Ber.* **1975**, *108*, 3898–3899.
- [105] T. Izumi, Y. Nishimoto, K. Kohei, A. Kasahara, *J. Heterocycl. Chem.* **1990**, *27*, 1419–1424.
- [106] L. E. Fisher, J. M. Muchowski, R. D. Clark, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2700–2705.
- [107] T. Nishi, F. Tabusa, T. Tanaka, T. Shimizu, T. Kanbe, Y. Kimura, K. Nakagawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 1151–1157.
- [108] G. Leclerc, G. Marciniak, N. Decker, J. Schwartz, *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 2427–2432, 2433–2438; N. Decker, M. Grima, J. Velly, G. Marciniak, G. Leclerc, J. Schwartz, *Arzneim. Forsch./Drug Res.* **1987**, *37*, 1108–1112.
- [109] K. Banno, T. Fujioka, T. Kikuchi, Y. Oshiro, T. Hiyama, K. Nakagawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 4377–4388.
- [110] C. Lugnier, M. Bruch, J.-C. Stoclet, M.-P. Strub, M. Marivet, C. G. Wermuth, *Eur. J. Med. Chem.-Chim. Ther.* **1985**, *20*, 121–125.
- [111] T. Shimizu, H. Mori, E. Tabusa, S. Morita, G. Miyamoto, Y. Yasuda, K. Nakagawa, *Xenobiotica* **1978**, *8*, 349–358.
- [112] D. Bouzard in *Recent Progress in the Chemical Synthesis of Antibiotics* (Hrsg.: G. Lukacs, M. Ohno), Springer, Berlin, **1990**, S. 249–283; M. P. Wentland, J. B. Cornett, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1985**, *20*, 145–154.
- [113] I. K. Nazer, *J. Agric. Entomol.* **1986**, *3*, 304–309;
- [114] C. M. Hall, H. G. Johnson, (Upjohn Co., USA), US 4181724, **1980** [*Chem. Abstr.* **1980**, *92*, 135453v].
- [115] P. K. Chakravarty, E. M. Naylor, A. Chen (Merck and Co., Inc., USA) PCT Int. Appl. WO 9410151, **1994** [*Chem. Abstr.* **1994**, *121*, 83355k].
- [116] S. Ito, H. Azuma, N. Funayama, T. Kubota, S. Sekizaki-Ohyama, M. Ishikawa, *Rep. Inst. Med. Dent. Eng. Tokyo Med. Dent. Univ.* **1990**, *24*, 41–48.
- [117] Asahi Chemical Industry Co., Ltd., Japan, JP 8216445, **1982** [*Chem. Abstr.* **1982**, *97*, 47183e]; H. Sato, S. Horie, N. Sekikawa, H. Ono (Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan), JP-A 75-89009, DE 2632656, **1977** [*Chem. Abstr.* **1977**, *86*, 171487u].
- [118] T. H. Cronin (Pfizer Inc.), US-A 700309, DE 2206946, **1971** [*Chem. Abstr.* **1972**, *76*, 3889b]; A. M. Farghaly, I. Chaaban, M. A. Khalil, A. A. Bekhit, *Alexandria J. Pharm. Sci.* **1990**, *4*, 52–56; A. S. A. Gallardo, ES-B 360677, **1970** [*Chem. Abstr.* **1971**, *74*, 100094e]; D. D. Mukerji, S. R. Nautiyal, C. R. Prasad, *Indian J. Pharm. Sci.* **1978**, *40*, 44–47; V. K. Pandey, *Biol. Mem.* **1985**, *11*, 213–215.
- [119] S. Sinha, M. Srivastava, *Prog. Drug Res.* **1994**, *43*, 143–238.
- [120] H. Kawashima, H. Sueyoshi (Nippon Steel Corp., Japan) JP 05304973 [93304973], **1993** [*Chem. Abstr.* **1994**, *120*, 132464k].
- [121] H. G. Kulla, *Chimia* **1991**, *45*, 81–85; P. Lehky, H. Kulla, S. Mischler (LONZA), EP-B 0152948, **1985** [*Chem. Abstr.* **1985**, *103*, 159132m].