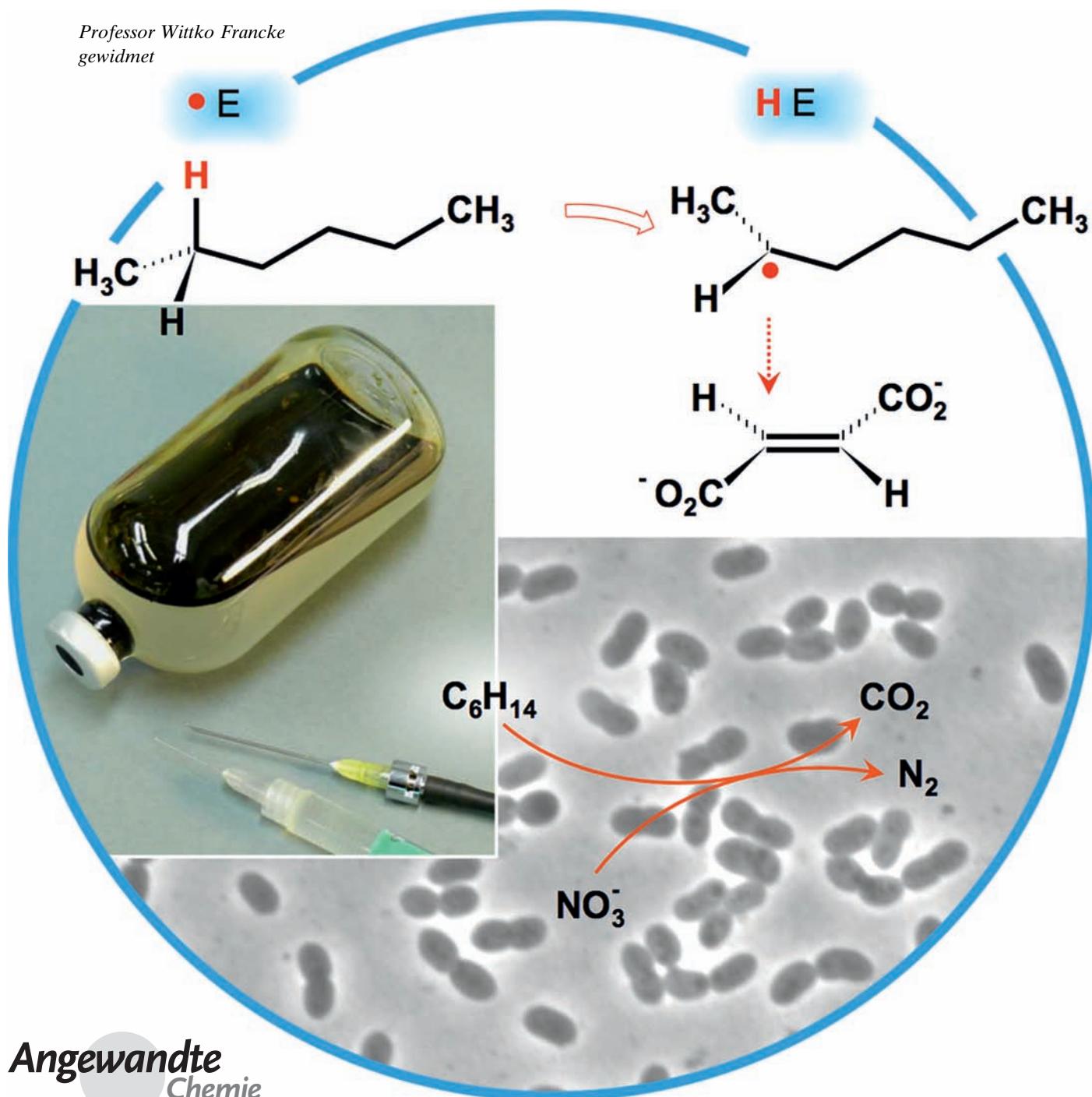


# Stereochemische Untersuchungen enthüllen den Mechanismus der sauerstofffreien Aktivierung von *n*-Alkanen durch Bakterien\*\*

René Jarling, Masih Sadeghi, Marta Drozdowska, Sven Lahme, Wolfgang Buckel, Ralf Rabus, Friedrich Widdel, Bernard T. Golding\* und Heinz Wilkes\*

Professor Wittko Francke  
gewidmet



Bestimmte heterotrophe Bakterien konservieren Energie durch Kopplung der vollständigen Oxidation von *n*-Alkanen zu Kohlendioxid an die Reduktion unterschiedlicher Elektronenakzeptoren. Aerobe *n*-Alkan-verwertende Bakterien, die seit dem Anfang des letzten Jahrhunderts bekannt sind, nutzen Disauerstoff nicht nur als terminalen Elektronenakzeptor, sondern auch als Cosubstrat für enzymatische Reaktionen, die diese inerten Substrate in sauerstoffhaltige Metabolite für den weiteren Abbau umwandeln.<sup>[1]</sup> Aufgrund dieser speziellen Funktion des Disauerstoffs bei der Aktivierung von *n*-Alkanen in aeroben Bakterien wurde die Verwertung dieser Substrate durch anaerobe Bakterien unter strikt anoxischen Bedingungen lange Zeit als unmöglich angesehen. In den letzten 20 Jahren wurden jedoch zahlreiche denitrifizierende, Eisen(III)-reduzierende und Sulfat-reduzierende Bakterien beschrieben, welche *n*-Alkane und andere Kohlenwasserstoffe in Abwesenheit von molekularem Sauerstoff zu CO<sub>2</sub> oxidieren.<sup>[2]</sup> Da *n*-Alkane ausschließlich unpolare C-H- $\sigma$ -Bindungen enthalten, ist ein homolytischer Mechanismus der enzymatischen Aktivierung am wahrscheinlichsten.<sup>[3]</sup> Dementsprechend nutzen anaerobe Bakterien häufig Glycylradikalenzyme zur selektiven Abstraktion eines Wasserstoffatoms von C2 des *n*-Alkans, was zur Addition eines Alk-2-ylradikals an die Doppelbindung von Fumarat (2) führt (Schema 1).<sup>[4,5]</sup>

Mechanistisch scheint diese Reaktion der Bildung von Benzylsuccinat aus Toluol durch das Glycylradikalenzym Benzylsuccinatsynthase zu ähneln.<sup>[6]</sup> In der Tat ergaben EPR-spektroskopische Untersuchungen deutliche Hinweise auf die Anwesenheit eines Glycylradikalenzys in Zellen des denitrifizierenden Betaproteobakteriums „*Aromatoleum*“ Stamm HxN1 beim anaeroben Wachstum mit *n*-Hexan.<sup>[4]</sup> Eine vermutete (1-Methylalkyl)succinatsynthase mit Ähnlichkeit zur Benzylsuccinatsynthase wurde nachgewiesen.<sup>[7]</sup>

[\*] R. Jarling, Priv.-Doz. Dr. H. Wilkes  
Organische Geochemie, Helmholtz-Zentrum Potsdam  
Deutsches GeoForschungsZentrum GFZ  
Haus B228, Telegrafenberg, 14473 Potsdam (Deutschland)  
E-Mail: wilkes@gfz-potsdam.de

M. Sadeghi, M. Drozdowska, Prof. Dr. B. T. Golding  
School of Chemistry, Bedson Building, Newcastle University  
NE1 7RU Newcastle upon Tyne (Großbritannien)  
E-Mail: bernard.golding@ncl.ac.uk

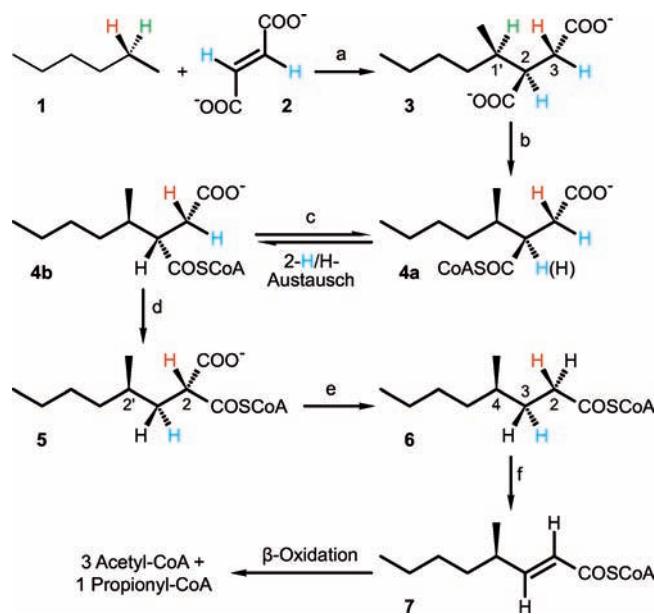
S. Lahme, Prof. Dr. R. Rabus  
Institut für Chemie und Biologie des Meeres, Universität Oldenburg  
Carl-von-Ossietzky Straße 9–11, 26111 Oldenburg (Deutschland)

S. Lahme, Prof. Dr. R. Rabus, Prof. Dr. F. Widdel  
Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie  
Celsiusstraße 1, 28359 Bremen (Deutschland)

Prof. Dr. W. Buckel  
Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie  
Karl-von-Frisch-Straße 10, 35043 Marburg (Deutschland)

[\*\*] Wir danken Göran Braedt, Cornelia Karger und Daniela Lange für technische Unterstützung. Dieses Projekt wurde unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Programm SPP 1319, H.W., R.R., B.T.G. und W.B.), COST Action CM0603 (B.T.G.), die Max-Planck-Gesellschaft (F.W. und W.B.), die Universität Oldenburg (R.R.) und die Helmholtz-Gemeinschaft (H.W.).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201106055> zu finden.



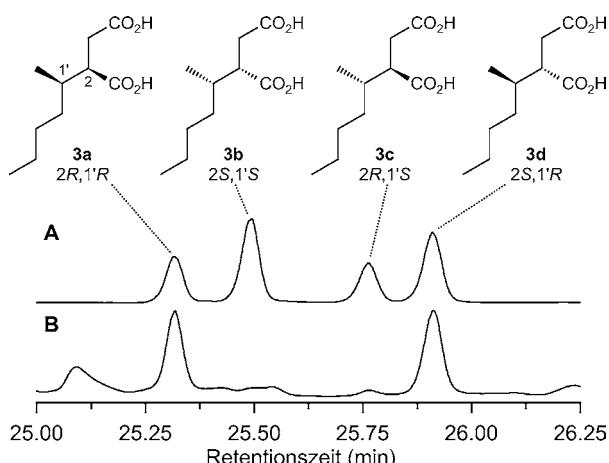
**Schema 1.** Einleitende Schritte bei der anaeroben Oxidation von *n*-Hexan im denitrifizierenden Stamm HxN1<sup>[9]</sup> unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit vorgeschlagenen Stereochemie der beteiligten Reaktionen. a) (1-Methylalkyl)succinat-Synthase; b) (1-Methylalkyl)succinat-CoA-Ligase; c) (1-Methylalkyl)succinyl-CoA-Epimerase; d) (2-Methylalkyl)malonyl-CoA-Mutase; e) (2-Methylalkyl)malonyl-CoA-Decarboxylase; f) 4-Methylalkanoyl-CoA-Dehydrogenase.

Allerdings ist die Abstraktion eines Wasserstoffatoms von einem *n*-Alkan wesentlich anspruchsvoller als ein solcher Prozess an der Methylgruppe von Toluol.<sup>[8]</sup> Um den Mechanismus der Funktionalisierung von *n*-Alkanen unter anoxischen Bedingungen besser zu verstehen, haben wir die Stereochemie dieser beispielhaften C-H-Aktivierung detailliert untersucht.

Die Analyse von Metaboliten in anaerob mit *n*-Hexan (1) gewachsenen Zellen von Stamm HxN1 zeigte, dass das gebildete (1-Methylpentyl)succinat (3) als Diastereomerenpaar vorliegt,<sup>[4]</sup> was auf eine unvollkommene Stereoselektivität der Enzymreaktion hinzudeuten schien. Die analoge Bildung von Benzylsuccinat aus Toluol durch die Benzylsuccinatsynthase führt ausschließlich zum (*R*)-Enantiomer.<sup>[10]</sup> Durch anaerobe Inkubation von Stamm HxN1 mit perdeuteriertem *n*-Hexan wurde herausgefunden, dass das abstrahierte C2-Wasserstoffatom vom *n*-Alkan auf die C3-Position des Succinats übertragen wird.<sup>[4]</sup> Es wurde vorgeschlagen, dass der weitere Abbau von 3 über die Aktivierung als Coenzym-A-thioester, eine intramolekulare Umlagerung zum (2-Methylhexyl)-malonyl-CoA (5) und anschließende Decarboxylierung zu 4-Methyloctanoyl-CoA (6) verläuft, welches durch Dehydrierung und  $\beta$ -Oxidation weiter abgebaut wird (Schema 1).<sup>[9]</sup>

Um die Konfiguration der neu gebildeten Stereozentren aufzuklären, haben wir alle vier Stereoisomere von 3 zum Vergleich synthetisiert. Dafür wurden racemisches bzw. reines (*R*)- oder (*S*)-Hexan-2-ol an der Hydroxygruppe aktiviert und mit Malonsäurediethylester substituiert, mit Bromessigsäureethylester alkyliert und nach Esterspaltung decarboxyliert (siehe Hintergrundinformationen). Die aus (*S*)-Hexan-2-ol [(2*R*,1*R*)- und (2*S*,1*R*)-Isomere 3a und 3d]

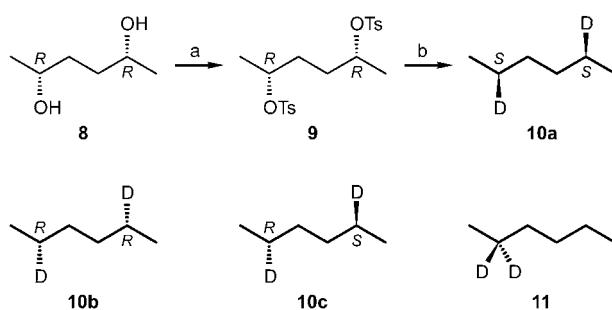
und (*R*)-Hexan-2-ol [(2*S*,1'*S*)- und (2*R*,1'*S*)-Isomere **3b** und **3c**] erhaltenen Gemische von **3** wurden direkt für die Analyse eingesetzt, während das aus racemischem Hexan-2-ol erhaltene Gemisch durch fraktionierende Kristallisation in die (2*R*,1'*R*)/(2*S*,1'*S*)-Isomere (**3a** und **3b**) bzw. (2*R*,1'*S*)/(2*S*,1'*R*)-Isomere (**3c** und **3d**) getrennt wurde. Wie in Abbildung 1 dargestellt, erzeugt Stamm HxN1 beim anaeroben Wachstum mit **1** ausschließlich **3a** und **3d** in gleichen Mengen. Dies zeigt,



**Abbildung 1.** Gaschromatogramme, die die spezifische Bildung der (2*R*,1'*R*)- und (2*S*,1'*R*)-Isomere von **3** während des anaeroben Wachstums von Stamm HxN1 mit **1** zeigen. A) Synthetisches Gemisch aller vier Stereoisomere; B) von Stamm HxN1 gebildete Produkte. Für die Trennung mit GC wurden die Stereoisomere von **3** mit (*R*)-1-Phenylethanan derivatisiert (siehe Hintergrundinformationen).

dass beide Konfigurationen an C2 des Succinats vorhanden sind. Dagegen trägt das Stereozentrum an C1' der Produkte (C2 des Kohlenwasserstoffs) einzig die (*R*)-Konfiguration. Infolgedessen wird nur (*R*)-4-Methyloctansäure als Produkt der anschließenden Schritte im Abbauweg gebildet, was durch Vergleich mit synthetischen authentischen Standards von (*R*)- und (*S*)-4-Methyloctansäure nachgewiesen wurde (siehe Hintergrundinformationen).

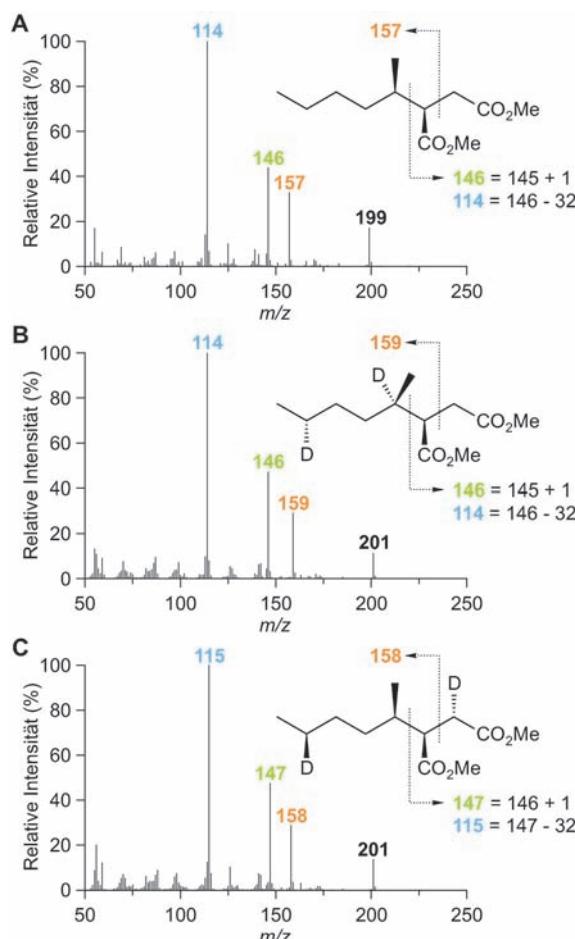
Eine derart vollständige Stereokontrolle bei der Bildung eines Stereozentrums an einem sekundären Alkylkohlenstoffatom ließ vermuten, dass die Abstraktion des Wasserstoffatoms vom *n*-Alkan ebenso stereoselektiv verläuft. Um dies näher zu untersuchen, haben wir den Verbleib der Deuteriumatome in den stereospezifisch markierten *n*-(2,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>)Hexanisomeren **10a-c** und *n*-(2,2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>)Hexan (**11**) beim anaeroben Wachstum von Stamm HxN1 verfolgt. Dazu wurde zunächst eine Synthese für (*R,R*)-, (*S,S*)- bzw. (*meso*)-*n*-(2,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>)Hexan aus (*S,S*)-, (*R,R*)- bzw. (*meso*)-Hexan-2,5-diol entwickelt; die in Schema 2 dargestellte Route für **10a** steht stellvertretend für die Synthese der anderen (2,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>)Hexane. Das Diol **8** wurde in sein Di-*p*-toluolsulfonat **9** überführt, welches anschließend mit Lithiumaluminiumdeuterid in Tetraethylenglycoldimethylether (Tetraglyme) unter Inversion der Konfiguration (S<sub>N</sub>2) an jedem Stereozentrum reduziert wurde.<sup>[11]</sup> Die Verwendung des hochsiedenden Lösungsmittels Tetraglyme (Sdp. 276°C) ermöglichte die direkte Abdestillation des reinen, deuterierten *n*-Hexans (Sdp. ≈ 69°C)



**Schema 2.** Synthese von (2*S*,5*S*)-*n*-(2,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>)Hexan (**10a**). a) *p*-Toluolsulfonchlorid, Pyridin in Dichlormethan (*p*-Toluolsulfonyl-Ts); b) LiAl<sup>2</sup>H<sub>4</sub> in Tetraglyme (für vollständige experimentelle Details siehe Hintergrundinformationen). Die Strukturen weiterer in dieser Arbeit verwendeter dideuterierter *n*-Hexane sind ebenfalls abgebildet.

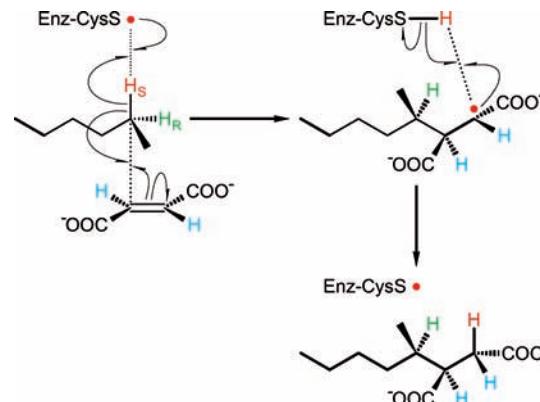
aus der Reaktionsmischung. Die stereochemische Zuordnung der *n*-(2,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>)Hexanisomere erfolgte anhand der bekannten Chiralität der Vorläuferdiol-e und durch röntgenkristallographische Untersuchungen der erhaltenen Di-*p*-toluolsulfonate (siehe Hintergrundinformationen). Die deuterierten *n*-Hexane wurden mithilfe von <sup>1</sup>H-, <sup>2</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie sowie Elektronenstoßionisations-Massenspektrometrie (EIMS) charakterisiert (siehe Hintergrundinformationen). Der abgeschätzte <sup>2</sup>H-Gehalt an jeder isotopenmarkierten Position lag über 98 %. Zuvor wurden bereits stereoisomere *n*-(2,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>)Butane mit geringer isotopischer Reinheit genutzt, um die aerobe Oxidation von *n*-Butan durch die membrangebundene Methanmonoxygenase (p-MMO) aus *Methylococcus capsulatus* (Bath) zu untersuchen.<sup>[12]</sup>

Die Inkubationsexperimente wurden mit *n*-Heptan-adaptierten Kulturen von Stamm HxN1 unter Verwendung eines Gemisches von *n*-Heptan und dideuteriertem *n*-Hexan (8:1) durchgeführt, um die Bildung von unmarkiertem **3** zu vermeiden. Die Rotationssymmetrie der *n*-(2,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>)Hexanisomere zwingt das Enzym, ein CHD-Zentrum mit definierter Konfiguration anzugreifen und erleichtert die Produktanalyse. Eine vollständige Übertragung eines Deuteriumatoms auf den Succinatrest von **3** wurde bei Zugabe von **10a** beobachtet, während mit **10b** keine nachweisbare Deuteriumübertragung stattfand (Abbildung 2). Dies beweist, dass während des Initialschritts des katalytischen Zyklus des (1-Methylpentyl)succinat-bildenden Enzyms ausschließlich das pro-*S*-Wasserstoffatom von C2 des *n*-Hexans (**1**) abstrahiert wird. Nachfolgend bindet die sekundäre Alkylspezies mit der dem abstrahierten Wasserstoff entgegengesetzten Seite an ein Fumaratmolekül, wodurch die (1'*R*)-Konfiguration in **3** erzeugt wird. Somit kommt es insgesamt zu einer Inversion der Konfiguration an C2 von **1**. Die Bildung von **3** wird durch die Rückübertragung des zuvor abstrahierten Wasserstoffatoms abgeschlossen, was zudem das Cysteinylradikal regeneriert. Die Wasserstoffabstraktion und die Addition an Fumarat könnten überdies, ähnlich einer S<sub>N</sub>2-Reaktion, konzertiert verlaufen (Schema 3). Ein derartiger Mechanismus könnte erklären, wie der hohe Unterschied der Bindungsdissoziationsenergien zwischen einem Thiol (RS-H) und einer Methylen-C-H-Bindung eines *n*-Alkans ( $\Delta BDE \approx 40 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) überwunden werden kann. Demgemäß würde das hochener-



**Abbildung 2.** Massenspektren, die das Markierungsmuster von deuterierten Isotopologen von **3** (als Dimethylester nach Derivatisierung mit Diazomethan) zeigen, die während des anaeroben Wachstums von Stamm HxN1 in Anwesenheit von stereospezifisch deuterierten *n*-Hexanen gebildet wurden. A) **3** gebildet aus **1**; B) ( $1',4'-2\text{H}_2$ )-**3** gebildet aus **10b**; C) ( $3,4'-2\text{H}_2$ )-**3** gebildet aus **10a**. Dargestellt sind die Massenspektren der ( $2R,1'R$ )-Isomere; im Wesentlichen identische Massenspektren wurden für die entsprechenden ( $2S,1'R$ )-Isomere erhalten. Das Fragmention mit  $m/z$  199 ( $[\text{M}-31]^+$ , resultierend aus dem Verlust von  $-\text{OCH}_3$  aus den Estergruppen) in (A) wird zu  $m/z$  201 in (B) und (C) verschoben, was die Anwesenheit von zwei Deuteriumatomen anzeigt. Das Fragmention mit  $m/z$  157 in (A) wird zu  $m/z$  159 bzw.  $m/z$  158 in (B) bzw. (C) verschoben. Die Fragmentionen mit  $m/z$  114 bzw.  $m/z$  146 in (A) werden zu  $m/z$  115 bzw.  $m/z$  147 in (C) verschoben, wohingegen keine Verschiebung in (B) beobachtet wird. Daraus folgt, dass ausschließlich das proS-Wasserstoffatom vom *n*-Alkan abstrahiert wird.

getische Hex-2-ylradikal nicht als einzelne, enzymgebundene Spezies existieren. Das einzige feststellbare Radikal in dieser Reaktion wäre das durch die benachbarte Carboxylgruppe stabilisierte Radikal an C3 des Succinatrests, welches dem Radikal ähneln würde, das während der durch die Glutamatmutase katalysierten Kohlenstoffgerüstumlagerung auftritt.<sup>[13]</sup> Mit **10c** sowie **11** wurden Gemische dideuterierter Isotopologe von **3** gebildet, wobei die Hauptprodukte durch Umlagerung der proS-Wasserstoffatome von C2 bzw. C5 entstehen (siehe Hintergrundinformationen). Dieser Befund belegt einen signifikanten primären Isotopeneffekt ( $\geq 3$ ) für die Abstraktion des Wasserstoffatoms.



**Schema 3.** Vorgeschlagener Mechanismus der (1-Methylpentyl)succinat-bildenden Enzymreaktion. Es ist zu beachten, dass die aktive Form des Enzyms durch die Abstraktion eines Wasserstoffatoms von einem benachbarten Cysteinrest durch das Glycylspeicherradikal gebildet wird.<sup>[3]</sup>

In Anbetracht der nachgewiesenen Stereoselektivität der Benzylsuccinatsynthase<sup>[10]</sup> ist die Bildung von gleichen Anteilen der Diastereomere **3a** und **3d** als Resultat einer nicht-stereoselektiven Addition des Hex-2-ylradikals an das Fumarat höchst unwahrscheinlich. Vielmehr weist der vollständige Austausch des aus ( $2,3\text{-}2\text{H}_2$ )Fumarat stammenden C2-Deuteriumatoms in **3** mit externem Wasserstoff<sup>[4]</sup> auf eine Epimerisierung hin. Ein Präzedenzfall einer solchen Reaktion wird durch die  $\alpha$ -Methylacyl-CoA-Racemase katalysiert,<sup>[14]</sup> ein Enzym, das für den Metabolismus bestimmter 2-Methylfettsäuren mit (*R*)-Konfiguration benötigt wird, da nur die (*S*)-Isomere als Substrat für die  $\beta$ -Oxidation fungieren. Daher schlagen wir vor, dass das eingangs gebildete Isomer von **3**, als CoA-Thioester **4**, epimerisiert wird, um das von der vermuteten Mutase benötigte Diastereomer zu generieren. Bemerkenswerterweise gehört die homologe  $\alpha$ -Methylacyl-CoA-Racemase aus *Mycobacterium tuberculosis* zur Familie III der CoA-Transferasen und stellt das einzige bekannte Beispiel einer CoA-Racemase in dieser relativ neuen Enzymfamilie dar.<sup>[15]</sup> Weitere Mitglieder dieser Superfamilie sind die (*E*)-Cinnamoyl-CoA:(*R*)-Phenyllactat-CoA-Transferase und die Succinyl-CoA:(*R*)-Benzylsuccinat-CoA-Transferase.<sup>[16]</sup> Aus diesem Grund spekulieren wir, dass die Aktivierung von **3** und die Epimerisierung von **4** in Stamm HxN1 durch ein und dasselbe Enzym katalysiert werden könnten.

Es ist beachtenswert, dass ausschließlich das aus **2** und nicht das aus **1** stammende Wasserstoffatom an C3 von **3** während der Kohlenstoffgerüstumlagerung von **4** zu **5** wandert (Schema 1).<sup>[9]</sup> Des Weiteren werden ausschließlich das aus **1** stammende Wasserstoffatom an C2 bzw. das aus **2** stammende Wasserstoffatom an C3 von **6** bei der Dehydrierung zu 4-Methyloct-2-enoyl-CoA (**7**) entfernt. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der zu erwartenden Stereochemie der durch die Acyl-CoA-Dehydrogenase katalysierten einleitenden Dehydrierung während der  $\beta$ -Oxidation.<sup>[17]</sup> Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die durch die Methylmalonyl-CoA-Mutase katalysierte analoge Decarbonylierung/Transcarboxylierung sowie die intramolekulare

Umlagerung des Methylmalonyl-CoA unter Retention der Konfiguration ablaufen,<sup>[18]</sup> kann der vollständige stereochemische Verlauf der (1-Methylpentyl)succinat-bildenden Reaktion und der nachfolgenden Schritte bis **7** vorgeschlagen werden (Schema 1). Dies erfordert eine *syn*-Addition von **1** an **2**, was in Übereinstimmung mit dem vorgeschlagenen Mechanismus der Benzylsuccinat synthase steht.<sup>[19]</sup> Der einzige Unterschied zur Umwandlung von Succinyl-CoA über (*R*)- und (*S*)-Methylmalonyl-CoA zu Propionyl-CoA ist die vermutete Decarboxylierung/Transcarboxylierung von (2*R*,2*R*')(2-Methylhexyl)malonyl-CoA (**5**) anstelle des (2*S*,2*R*)-Isomers. Dafür würde eine zweite Epimerase benötigt, was nicht mit dem Verbleib des aus **1** stammenden Wasserstoffatoms an C2 von **6** im Einklang wäre.

Zusammenfassend belegen unsere Ergebnisse eine höchst stereospezifische anaerobe C-H-Aktivierung eines *n*-Alkans, deren stereochemische Besonderheiten im völligen Gegensatz zur aeroben Oxidation von Methylengruppen durch Cytochrom P450 und andere Monooxidasen stehen, bei denen ein mit Retention der Konfiguration einhergehender Weg bevorzugt wird.<sup>[12,20]</sup> Weitere Untersuchungen zur Bestätigung der postulierten Epimerisierung des eingangs gebildeten Diastereomers von **3** mit definierter Konfiguration an C2 sind auf dem Weg.

Eingegangen am 26. August 2011

Online veröffentlicht am 30. November 2011

**Stichwörter:** Alkane · C-H-Aktivierung · Enzymmechanismen · Radikalenzyme · Stereochemie

[1] F. Widdel, F. Musat in *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (Hrsg.: K. N. Timmis), Springer, Berlin, **2010**, S. 981.

[2] F. Widdel, K. Knittel, A. Galushko in *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (Hrsg.: K. N. Timmis), Springer, Berlin, **2010**, S. 1997.  
[3] J. Heider, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 188.  
[4] R. Rabus, H. Wilkes, A. Behrends, A. Armstroff, T. Fischer, A. J. Pierik, F. Widdel, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 1707.  
[5] F. Widdel, O. Grundmann in *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (Hrsg.: K. N. Timmis), Springer, Berlin, **2010**, S. 909.  
[6] B. Leuthner, C. Leutwein, H. Schulz, P. Hörth, W. Haehnel, E. Schiltz, H. Schägger, J. Heider, *Mol. Microbiol.* **1998**, *28*, 615.  
[7] O. Grundmann, A. Behrends, R. Rabus, J. Amann, T. Halder, J. Heider, F. Widdel, *Environ. Microbiol.* **2008**, *10*, 376.  
[8] J. Hioe, H. Zipse, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 3609.  
[9] H. Wilkes, R. Rabus, T. Fischer, A. Armstroff, A. Behrends, F. Widdel, *Arch. Microbiol.* **2002**, *177*, 235.  
[10] a) H. R. Beller, A. M. Spormann, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 5454; b) C. Leutwein, J. Heider, *Microbiology* **1999**, *145*, 3265.  
[11] V. Baillif, R. J. Robins, I. Billault, P. Lesot, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11180.  
[12] K.-Y. Ng, L.-C. Tu, Y.-S. Wang, S. I. Chan, S. S. F. Yu, *Chem-BioChem* **2008**, *9*, 1116.  
[13] H. Bothe, D. J. Darley, S. P. J. Albracht, G. J. Gerfen, B. T. Golding, W. Buckel, *Biochemistry* **1998**, *37*, 4105.  
[14] D. J. Darley, D. S. Butler, S. J. Prideaux, T. W. Thornton, A. D. Wilson, T. J. Woodman, M. D. Threadgill, M. D. Lloyd, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 543.  
[15] P. Bhaumik, W. Schmitz, A. Hassinen, J. K. Hiltunen, E. Conzelmann, R. K. Wierenga, *J. Mol. Biol.* **2007**, *367*, 1145.  
[16] J. Heider, *FEBS Lett.* **2001**, *509*, 345.  
[17] C. Thorpe, J. Kim, *FASEB J.* **1995**, *9*, 718.  
[18] a) J. Rétey, J. A. Robinson, *Stereospecificity in Organic Chemistry and Enzymology*, Verlag Chemie, Weinheim, **1981**; b) J. Rétey in *B12. 2. Biochemistry and Medicine* (Hrsg.: D. Dolphin), Wiley, New York, **1982**, S. 357.  
[19] C. Qiao, E. N. G. Marsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8608.  
[20] a) P. R. Ortiz de Montellano, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 932; b) S. Shapiro, E. Caspi, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 5005.