

Regioselektive *o*-Hydroxylierung monosubstituierter Benzole mit P450 BM3**

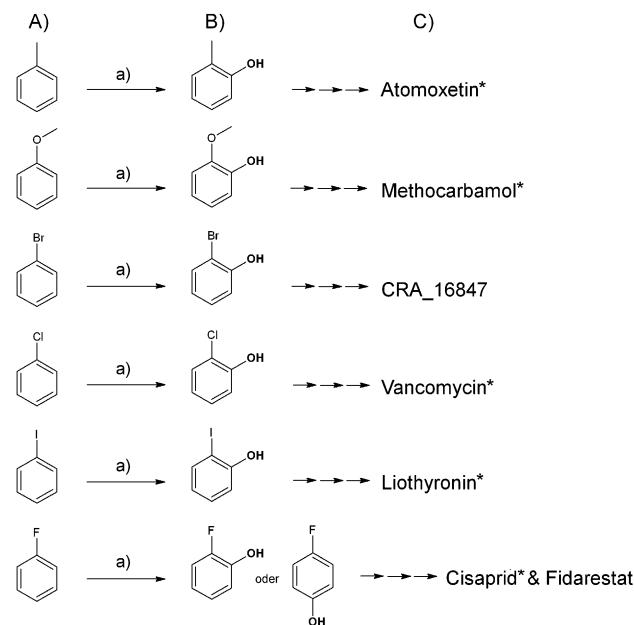
Alexander Dennig, Nina Lülsdorf, Haifeng Liu und Ulrich Schwaneberg*

Halogenierte Phenole sind wichtige Bausteine zur Synthese von Vitaminen, Lipidsenkern und anderen Medikamenten.^[1] Klassisch werden halogenierte Phenole in chemischen Verfahren^[2] wie der Iodphenolsynthese unter Einsatz toxischer Reagenzien wie (Hg/Ti)-Acetat hergestellt.^[2b,3] Chlor- und Bromphenole werden mittels elektrophiler Halogenierung unter Verwendung von Br₂ und Cl₂ hergestellt, wobei zumeist ein Hauptproduktgemisch aus *o*- und *p*-Phenolen mit Nebenprodukten wie Dichlorphenol entsteht.^[1b,c] Isomerenreine Verbindungen für die Arzneimittelsynthese werden zumeist aufwendig aufgereinigt.^[1e,4] Guaiacol und dessen Derivate Vanillin und Eugenol werden als Duft- und Geschmacksstoffe sowie als Antioxidantien in der Krebstherapie verwendet, darüber hinaus auch in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen sowie von Parkinson und Alzheimer.^[5] Guaiacol kann aus Pflanzen isoliert oder synthetisch aus Catechol mit NaOH und weiteren korrosiven Reagenzien hergestellt werden.^[6] Die direkte chemische Hydroxylierung von substituierten Benzolen ist synthetisch unattraktiv, da Reaktionen an nicht-aktivierten C-Atomen zumeist unselektiv sind^[7] und nicht am aromatischen Ring stattfinden.^[8]

Biokatalytische Prozesse erlauben einen neuen und direkten Zugang zur aromatischen Hydroxylierung von Benzolen.^[4,9] Mit Wasser als Reaktionsmedium wird der Einsatz organischer Lösungsmittel minimiert, und zeitgleich anfallende toxische oder korrosive Nebenprodukte wie HBr und HCl werden vermieden.^[1a,b,7,9a,10] Insbesondere das Potential zur regio- und enantioselektiven Synthese macht enzymatische Hydroxylierungen attraktiv für die Produktion von Pharmazeutika.^[4,7,9b] Zumeist genügen Eigenschaften des Enzyms nicht den Anforderungen technischer Prozesses, was häufig als unzureichende „operative Stabilität“ umschrieben wird.^[11] Peroxidasen wurden als Phenol-halogenierende Enzyme beschrieben, die jedoch nur eine geringe Selektivität aufweisen.^[9a] Die gelenkte Evolution von Enzymen erlaubt die Herstellung maßgeschneiderter Katalysatoren, die in ihren Eigenschaften den prozesstechnischen Anforderungen genügen.^[12]

P450 BM3 ist eine Häm-enthaltende und industriell bedeutende Monooxygenase,^[13] die in der Lage ist, Benzole mit hoher Aktivität und Selektivität zu hydroxylieren.^[12a,d,14] Der Mechanismus der aromatischen Hydroxylierung wurde durch de Visser und Shaik im Detail beschrieben und umfasst die Bildung einer Epoxid-Zwischenstufe, die nach NIH-Verschiebung zum phenolischen Produkt rearomatisiert.^[15] Experimentell wurde letzteres von Whitehouse et al. beschrieben.^[14] 2012 wurde die P450 BM3-Variante M2 (R47S/Y51W/I401M) in unserer Gruppe für die regioselektive und aromatische Hydroxylierung von *p*-Xylol entwickelt.^[12a]

Hier beschreiben wir die direkte aromatische Hydroxylierung von sechs monosubstituierten Benzolen (Schema 1) mit der Variante M2, um *o*-substituierte Phenole mithilfe von O₂ bei Raumtemperatur und in Wasser (KPi 50 mM, pH 7.5) herzustellen. Systematisch wurden sechs unterschiedliche Ring-Substituenten (F, Cl, Br, I, CH₃ und OCH₃) ausgewählt und deren Einfluss auf die Regioselektivität und Hydroxylierungsaktivität von M2 untersucht. Zusätzlich wurden 25 weitere Substrate untersucht, darunter Nitrobenzol und Anilin (siehe Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen).



Schema 1. A) Substrate, die mit der Variante M2 (R47S/Y51W/I401M) von P450 BM3 untersucht wurden. a) P450 BM3 M2 (0.075 μ M), O₂, RT, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7.5), NADPH. B) Durch aromatische Hydroxylierung mittels M2 erzeugte Produkte. C) Ausgewählte von der FDA zugelassene Arzneistoffe mit Strukturmotiven der Produkte aus (B) (<http://www.drugbank.ca>). * Von der FDA zugelassene Verbindungen.

[*] A. Dennig, N. Lülsdorf, Dr. H. Liu, Prof. Dr. U. Schwaneberg
Institut für Biotechnologie, RWTH Aachen University
Worringerweg 1, 52074 Aachen (Deutschland)
E-Mail: u.schwaneberg@biotec.rwth-aachen.de
Homepage: <http://www.biotec.rwth-aachen.de/>

[**] Die Autoren danken der EU für finanzielle Förderung im Rahmen des 7th Framework Project OXYGREEN (FP7-KBBE; Project Reference: 212281).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (Protokoll zur semi-präparativen Herstellung der *o*-Phenole, GC-FID-Chromatogramme und GC-MS Daten für alle erzeugten Produkte) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201303986> zu finden.

Tabelle 1: Katalytische Parameter von P450 BM3 (Wildtyp, WT) und Variante M2 für die aromatische Hydroxylierung von sechs Substraten.

Variante	Substrat	iTOF ^[a] [s ⁻¹]	TOF ^[b] [300 s ⁻¹]	U/mg _{P450} ^[c]	C [%] ^[d]	Phenol [%] <i>o</i> - <i>m/p</i> -
WT	Anisol	n.d.	362.3 ± 91.9	n.d.	11 ± 4	> 90
M2	Anisol	38.6 ± 1.8	2427.4 ± 172.7	19.5	44 ± 4	> 95
WT	Toluol	n.d.	83.5 ± 8.4	n.d.	10 ± 3	> 95
M2	Toluol	14.6 ± 0.6	1062.9 ± 107.6	7.4	48 ± 4	> 99
WT	Fluorbenzol	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.
M2	Fluorbenzol	n.d.	67.2 ± 30.7 ^[g]	0.02	6 ± 3	49
WT	Chlorbenzol	n.d.	237.5 ± 38.6	n.d.	6 ± 3	> 96
M2	Chlorbenzol	12.3 ± 1.3	1923.4 ± 116.5	6.2	28 ± 4	> 99
WT	Brombenzol	n.d.	169.8 ± 12.3	n.d.	5 ± 3	> 97
M2	Brombenzol	7.7 ± 1.3	1993.7 ± 88.3	3.8	29 ± 6	> 99
WT	Iodbenzol	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.
M2	Iodbenzol	2 ± 0.7	205.4 ± 20.8	0.97	23 ± 8	> 99

[a] Anfangsumsatzgeschwindigkeit (iTOF) [$\mu\text{mol}_{\text{Produkt}} \mu\text{mol}_{\text{P450}}^{-1} \text{s}^{-1}$]. [b] TOF [$\mu\text{mol}_{\text{Produkt}} \mu\text{mol}_{\text{P450}}^{-1} 300 \text{s}^{-1}$]. [c] $\mu\text{mol}_{\text{Phenol}} \text{min}^{-1} \text{mg}_{\text{P450}}^{-1}$; [d] Kupplungseffizienz; n.d. = nicht detektiert. [e] 3 % Benzylalkohol wurde gebildet. [f] 51.1 % Phenol (GC-Fläche; Abbildung S5); Werte, die nach 300 s gemessen werden, können NADPH-limitiert sein. [g] Gemessen nach 30 min Reaktionszeit.

Ein Protokoll für die semipräparative Synthese von Guaiacol und *o*-Kresol wurde ebenfalls ausgearbeitet. Zur Produktquantifizierung wurden das sensitive und regioselektive Absorptionsnachweissystem 4-AAP^[16] sowie GC-FID und GC-MS-Chromatographie verwendet (siehe Hintergrundinformationen). Zu erwähnen ist, dass alle Hydroxylierungen ohne zusätzliche Lösungsvermittler, wie z. B. DMSO, durchgeführt wurden, trotz der schlechten Löslichkeit der Substrate in wässriger Lösung (< 2 g L⁻¹).^[17]

Tabelle 1 und Abbildung S1 zeigen, dass Wildtyp-P450 BM3 eine geringe Aktivität und Produktbildung bietet, die 0.6 U/mg_{P450} nicht überschreitet. Von Fluor- und Iodbenzol wurden keine Hydroxylierungsprodukte detektiert. M2 hydroxyliert hingegen alle sechs Substrate inklusive Fluor- und Iodbenzol. Basierend auf Anfangsumsatzgeschwindigkeiten (iTOFs) ist insbesondere die aromatische Hydroxylierung von Anisol hervorzuheben, für die 19.5 U/mg_{P450} erzielt wurden. Eine iTOF von 38.6 s⁻¹ und eine spezifische Aktivität von 19.5 U/mg_{P450} stellen unseres Wissens die höchste Produktbildungsgeschwindigkeit für eine direkte aromatische Hydroxylierung eines Benzols durch eine Monooxygenase dar.^[13] Ebenso bedeutsam ist, dass die Produktbildung von Guaiacol dreifach schneller ist als für *o*-Kresol (7.4 U/mg_{P450}). Ein Grund für die Aktivitätsunterschiede sind unterschiedliche sterische Anforderungen von Substraten innerhalb des aktiven Zentrums (Tabelle 1; Schema 1).^[12a, 13] Toluol, Brom- und Chlorbenzol wurden ebenfalls signifikant schneller durch die Variante M2 umgesetzt (Faktor 12.7, 8 bzw. 11.7), auch unter NADPH-limitierten Bedingungen (TOF-Werte in Tabelle 1 und Abbildung S1).

Beide untersuchten P450-Monooxygenasen (Wildtyp und Variante M2) zeigen eine exzellente Regioselektivität (> 90 % *o*-Hydroxylierung), wobei M2 für die *o*-Hydroxylierung von Toluol und halogenierten Substraten quantitative Werte erreicht (Tabelle 1). Die einzige Ausnahme stellt Fluorbenzol dar, das mittels M2 im Verhältnis 49:51 hydroxyliert

wird (*o*- zu *p*-Hydroxylierung; kein *m*-Produkt; 3-Fluorphenol wird jedoch von eukaryotischen P450 gebildet^[18]). Der Fluor-Substituent beeinflusst durch seine hohe Elektronegativität^[19] die π - π -Wechselwirkungen von Substrat mit Phenylalanin 87 (F87). Die Schwächung der π - π -Wechselwirkungen könnte zu einem Verlust der präzisen sterischen Kontrolle des Substrats durch F87 führen, sodass *o/p*-Produktgemische gebildet werden.^[20] Die potentielle Rolle von F87 für die aromatische Hydroxylierung von *p*-Xylool wurde von uns postuliert (Abbildung 1 und 2).^[12a, 21] Die regioselektive Hydroxylierung der ausgewählten Benzole durch Wildtyp-BM3 und M2 wird durch Protein-Substrat-Interaktionen gesteuert, die eine spezifische Orientierung des Substrats in Richtung T268 ermöglichen, das eine Schlüsselrolle in der Sauerstoffaktivierung und Substraterkennung spielt (Abbildung 1).^[13, 22] Vergleichsweise „kleine“ Substrate wie Benzole müssen für eine regiospezifische Hydroxylierung

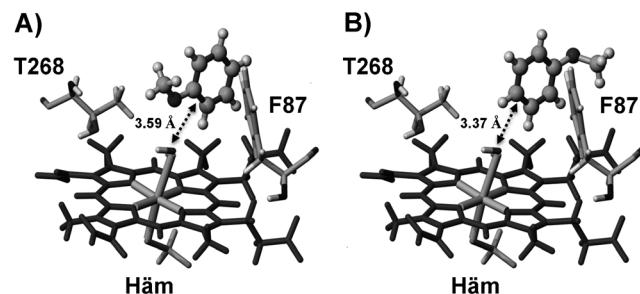


Abbildung 1: Aktives Zentrum von P450 BM3 (PDB: 1BU7) mit Anisol als Substrat (Kugel-Stab-Darstellung) in T-förmiger Orientierung und mit den Bindungsenergien A) $-4.98 \text{ kcal mol}^{-1}$ und B) $-5.46 \text{ kcal mol}^{-1}$.^[29] Konformation A ermöglicht die Hydroxylierung in *o*-Position; Konformation B würde bevorzugt zu einer Hydroxylierung in *p*-Position führen. Häm, T268 (Sauerstoffaktivierung)^[22] und F87 (essentiell für aromatische Hydroxylierung)^[12a] werden in Stab-Darstellung gezeigt. Der kürzeste Abstand (in Å) zwischen dem C-Atom von Anisol und Häm-gebundenen H₂O-Liganden ist mit einem Pfeil markiert.

präzise in der Bindungstasche ausgerichtet sein, da P450 BM3 in der Lage ist, z. B. polycyclische Arene zu hydroxylieren.^[23] Regioselektivität wird innerhalb von P450 BM3 durch eine exakte räumliche Bindung und Orientierung von Substraten erreicht, wobei die intrinsische Reaktivität des Substrats, im Gegensatz zu den meisten chemischen Synthesen, eine untergeordnete Rolle spielt.^[24] Abbildung 2 zeigt, wie Anisol zwischen den Aminosäuren F87 (Orientierungsfunktion) und T268 (Sauerstoffaktivierungsfunktion) sowie dem Häm-Eisen (katalytisches Zentrum) eingebettet ist. Anisol ist zum aktiven Zentrum in einer T-förmigen Konformation exzellent orientiert, mit starken Bindungsenergien von -4.98 und -5.46 kcal mol $^{-1}$.

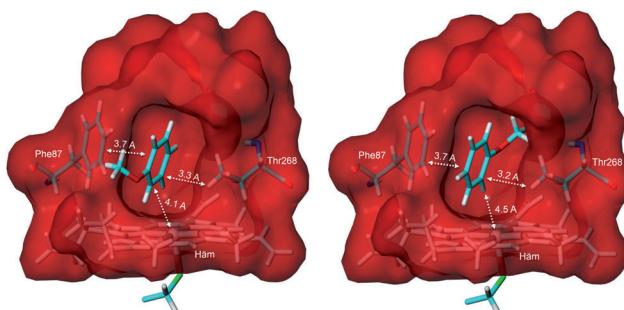


Abbildung 2. Aktives Zentrum von P450 BM3 (PDB: 1BU7) mit Anisol gedockt in den zwei möglichen T-förmigen Orientierungen. Die rote Form zeigt die Strukturfüllung durch Aminosäuren von P450 BM3 im aktiven Zentrum mit <4 Å Abstand zu Anisol. Die Abstände (in Å) zwischen Substrat und katalytisch wichtigen Proteinstrukturen (F87, T268 und Häm) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Beide Orientierungen des Substrats erlauben eine bevorzugte Bildung des *o*-Phenols. Das Docking wurde mittels VINA docking plug-in^[32] für YASARA durchgeführt.^[29]

Ein wichtiger Parameter für P450-Monooxygenasen ist die Kupplungseffizienz der katalysierten Reaktion, welche als Maßstab für die effiziente Nutzung von NADPH gilt.^[13] Eine hohe Kupplungseffizienz setzt voraus, dass das Substrat in einer Bindungstasche als Sauerstofffakzeptor fungiert und nicht vor der Sauerstoffübertragung seine Positionierung ändert.^[25] Wildtyp-BM3 zeigte Kupplungseffizienzen von 5–11 % (Tabelle 1). Bei Iodbenzol wurde kein NADPH-Verbrauch gemessen. Ähnlich wie für DMSO berichtet wurde, könnte eine Interaktion zwischen Iodbenzol und R47 stattfinden, wobei das Iodbenzol an das positiv geladene Arginin bindet und den Eingang zum aktiven Zentrum blockiert.^[26] Im Fall von Fluorbenzol wurde ein NADPH-Verbrauch ohne detektierbare Produktbildung gemessen. Die Bildung von Fluorbenzol in der Bindungstasche induziert den Elektronentransfer zum Häm (Low-Spin zu High-Spin),^[27] sodass O₂ an das Eisen im Häm binden kann.^[28] Letztlich werden H₂O₂ und reaktive O₂-Spezies gebildet, falls das Substrat sich nicht in „Akzeptor“-Distanz zu T268 befindet^[13] und/oder kein H-Atom zur Abstraktion in Reichweite ist.^[25a] Die Variante M2 zeigt im Vergleich zum BM3-Wildtyp signifikant höhere Kupplungseffizienzen von 23–48 % (Tabelle 1). Insbesondere die Umsetzung von Toluol und Anisol wird mit einer für P450-Monooxygenasen exzellenten Kupplungseffizienz

durchgeführt (48%).^[13] Des Weiteren sind die Kupplungseffizienzen für Brom- und Chlorbenzol um das sechs- bzw. fünfache erhöht im Vergleich zum Wildtyp. Ferner wurde eine semipräparative Umsetzung von Anisol und Toluol mit 10⁻⁴ Mol-% P450 BM3M2 und einem Produkttiter von 0.67 g L⁻¹ (6195 TTN; total turnover number) bzw. 0.31 g L⁻¹ (2870 TTN) erreicht (Tabelle 1).

Hauptunterschiede zwischen den Ringsubstituenten (OCH₃, CH₃, Cl, Br, I, F) sind sterische Anforderungen und die Elektronegativität.^[19] π - π -Wechselwirkungen zwischen F87 und monosubstituierten Benzolen können in vier unterschiedlichen Stapelwechselwirkungen stattfinden: a) π - π -gestapelt, b) dimer, c) T-förmig und d) invers T-förmig.^[21] Je nach Orientierung variiert der Abstand zwischen zwei aromatischen Ringen von 3.5 (b) zu 6.0 Å (d), was zu Unterschieden in den Bindungsenergien zwischen -5.38 (a) und -0.88 kcal mol $^{-1}$ (d) führt.^[21] Die exzelle *o*-Hydroxylierungselektivität von BM3 und Variante M2 ist somit ein klares Indiz, dass die ausgewählten Substrate (Tabelle 1) eine bevorzugte Bindungsorientierung haben.

Dockingstudien von Anisol an das aktive Zentrum von P450 BM3 resultierten in einer bevorzugten T-förmigen Orientierung zu F87 (A und B in Abbildung 1) mit Bindungsenergien von -4.98 (A) und -5.46 kcal mol $^{-1}$ (B). Abbildung 2 zeigt beide Orientierungen (Inversion der OCH₃-Gruppe) mit den bevorzugten Bindungsenergien und verdeutlicht die Interaktion von Anisol mit F87 in T-förmiger Orientierung. Konformation A positioniert die *o*-Position direkt in Richtung der reaktiven Sauerstoffspezies, die zwischen T268 und dem Häm-Eisen gebildet wird.^[14,15] Konformation B würde ein anderes Produktmuster generieren, wobei überwiegend *p*- und *m*-Phenole entstünden, die experimentell jedoch nicht oder nur in geringem Umfang gebildet werden (Tabelle 1). Dieser Befund stützt die Hypothese, dass Konformation A (Abbildung 1) die bevorzugte Substratbindungsorientierung in BM3 darstellt. Trotz großer Übereinstimmung zwischen Dockingergebnissen und experimentellen Daten ist zu berücksichtigen, dass die auftretende Dynamik innerhalb des aktiven Zentrums nicht berücksichtigt wird.^[13] Folgende Korrelation zwischen Atomgröße, Elektronegativität und Reaktivität der untersuchten halogenierten Substrate wurde experimentell für die Variante M2 ermittelt: Cl > Br > I (Tabelle 1).^[14] Die höhere Aktivität für Chlorbenzol kann durch die höhere Elektronegativität des Substituenten erklärt werden, die zu einer schnelleren Ausbildung der Epoxid-Zwischenstufe führen könnte.^[15] Elektronenreiche Substituenten, z. B. Iod, können die Epoxid-Zwischenstufe tendenziell stabilisieren, was in einer langsameren Aromatisierung resultiert.^[30] Ferner kann P450 BM3M2 Iodbenzol zum Phenol dehalogenieren (51.1 %, GC).^[31]

Zusammengefasst wurde erstmalig die direkte Hydroxylierung von halogenierten Benzolen mit nahezu quantitativer Regioselektivität für Chlor-, Brom- und Iodbenzol mittels einer maßgeschneiderten M2-Variante von P450 BM3 erzielt. Die Phenolprodukte wurden bei Raumtemperatur, in Wasser, mit Luftsauerstoff und ohne zusätzliche Lösungsmittel gebildet. Die beschriebenen Phenole sind attraktive Synthesebausteine, und der Hydroxylierungsweg eröffnet einen neuen und direkten Zugang zu hydroxylierten Halogenben-

zolen. M2 zeichnet sich durch exzellente Selektivität (> 99 %) und Aktivität (19.5 U/mg_{P450}; 0.67 g L⁻¹ Produkt; TTN von 6195) aus, wobei die Kupplungseffizienzen gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöht wurden.

Eingegangen am 9. Mai 2013

Online veröffentlicht am 1. Juli 2013

Stichwörter: Hydroxylierung · Monooxygenasen · P450 · Phenol · Regioselektivität

- [1] a) S. Bhunia, D. Saha, S. Koner, *Langmuir* **2011**, *27*, 15322–15329; b) A.-J. Chen, S.-T. Wong, C.-C. Hwang, C.-Y. Mou, *ACS Catal.* **2011**, *1*, 786–793; c) M. Deborde, U. von Gunten, *Water Res.* **2008**, *42*, 13–51; d) A. F. Duque, S. A. Hasan, V. S. Bessa, M. F. Carvalho, G. Samin, D. B. Janssen, P. M. Castro, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *95*, 511–520; e) M. Shehata, J. Durner, D. Thiessen, M. Shirin, S. Lottner, K. Van Landuyt, S. Furche, R. Hickel, F. X. Reichl, *Arch. Toxicol.* **2012**, *86*, 1423–1429.
- [2] a) S. Rayne, K. Forest, K. J. Friesen, *Environ. Int.* **2009**, *35*, 425–437; b) R. J. Schmidt, *Appl. Catal. A* **2005**, *280*, 89–103; c) D. Vione, V. Maurino, C. Minero, P. Calza, E. Pelizzetti, *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 5066–5075.
- [3] R. C. Cambie, P. S. Rutledge, T. Smith-Palmer, P. D. Woodgate, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1976**, *1161*–1164.
- [4] D. J. Pollard, J. M. Woodley, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 66–73.
- [5] A. Galano, J. R. Leon-Carmona, J. R. Alvarez-Idaboy, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 7129–7137.
- [6] a) M. H. Mageroy, D. M. Tieman, A. Floystad, M. G. Taylor, H. J. Klee, *Plant J.* **2012**, *69*, 1043–1051; b) M. B. Talawar, T. M. Jyothi, P. D. Sawant, T. Raja, B. S. Rao, *Green Chem.* **2000**, *2*, 266–268.
- [7] J. C. Lewis, P. S. Coelho, F. H. Arnold, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2003–2021.
- [8] P. Zhang, Y. Gong, H. Li, Z. Chen, Y. Wang, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1593.
- [9] a) F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, K. Buehler, A. Schallmey, B. Bühler, *Green Chem.* **2011**, *13*, 226–265; b) R. N. Patel, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 587–604; c) S. Quideau, *Nature* **2011**, *474*, 459–460.
- [10] P. J. Dunn, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1452–1461.
- [11] H. E. Schoemaker, D. Mink, M. G. Wubbolts, *Science* **2003**, *299*, 1694–1697.
- [12] a) A. Dennig, J. Marienhagen, A. J. Ruff, L. Guddat, U. Schwaneberg, *ChemCatChem* **2012**, *4*, 771–773; b) M. T. Reetz, J. D. Carballeira, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 891–903; c) A. V. Shivanage, J. Marienhagen, H. Mundhada, A. Schenk, U. Schwaneberg, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 19–25; d) C. J. Whitehouse, W. Yang, J. A. Yorke, B. C. Rowlett, A. J. Strong, C. F. Blanford, S. G. Bell, M. Bartlam, L. L. Wong, Z. Rao, *Chem.-BioChem* **2010**, *11*, 2549–2556.
- [13] C. J. Whitehouse, S. G. Bell, L. L. Wong, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1218–1260.
- [14] C. J. Whitehouse, N. H. Rees, S. G. Bell, L. L. Wong, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 6862–6868.
- [15] S. P. de Visser, S. Shaik, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7413–7424.
- [16] T. S. Wong, N. Wu, D. Roccato, M. Zacharias, U. Schwaneberg, *J. Biomol. Screening* **2005**, *10*, 246–252.
- [17] Weitere Informationen zur Löslichkeit der verwendeten Substrate in wässrigen oder gepufferten Lösungen finden sich unter: <http://www.pharmacy.arizona.edu/outreach/aquasol/>.
- [18] I. M. Rietjens, A. E. Soffers, C. Veeger, J. Vervoort, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4801–4812.
- [19] A. R. Campanelli, A. Domenicano, F. Ramondo, I. Hargittai, *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 4940–4948.
- [20] L. L. Wu, C. L. Yang, F. C. Lo, C. H. Chiang, C. W. Chang, K. Y. Ng, H. H. Chou, H. Y. Hung, S. I. Chan, S. S. Yu, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 4774–4787.
- [21] L. M. Salonen, M. Ellermann, F. Diederich, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4908–4944; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4808–4842.
- [22] J. P. Clark, C. S. Miles, C. G. Mowat, M. D. Walkinshaw, G. A. Reid, S. N. Daff, S. K. Chapman, *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 1075–1090.
- [23] a) D. Appel, S. Lutz-Wahl, P. Fischer, U. Schwaneberg, R. D. Schmid, *J. Biotechnol.* **2001**, *88*, 167–171; b) A. B. Carmichael, L. L. Wong, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 3117–3125.
- [24] R. Breslow, *Acc. Chem. Res.* **1980**, *13*, 170–177.
- [25] a) P. J. Loida, S. G. Sligar, *Biochemistry* **1993**, *32*, 11530–11538; b) A. W. Munro, *Trends Biomed. Sci.* **2002**, *27*, 250–257.
- [26] D. Roccato, T. S. Wong, U. Schwaneberg, M. Zacharias, *Bio-polymers* **2006**, *83*, 467–476.
- [27] T. W. Ost, J. Clark, C. G. Mowat, C. S. Miles, M. D. Walkinshaw, G. A. Reid, S. K. Chapman, S. Daff, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15010–15020.
- [28] B. Meunier, S. P. de Visser, S. Shaik, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3947–3980.
- [29] E. Krieger, G. Koraimann, G. Vriend, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2002**, *47*, 393–402.
- [30] D. Feichtinger, D. A. Plattner, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 591–599.
- [31] a) A. Gilchrist, L. E. Sutton, *J. Phys. Chem.* **1952**, *56*, 319–321; b) J. L. Lippert, M. W. Hanna, P. J. Trotter, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 4035–4044.
- [32] O. Trott, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455–461.