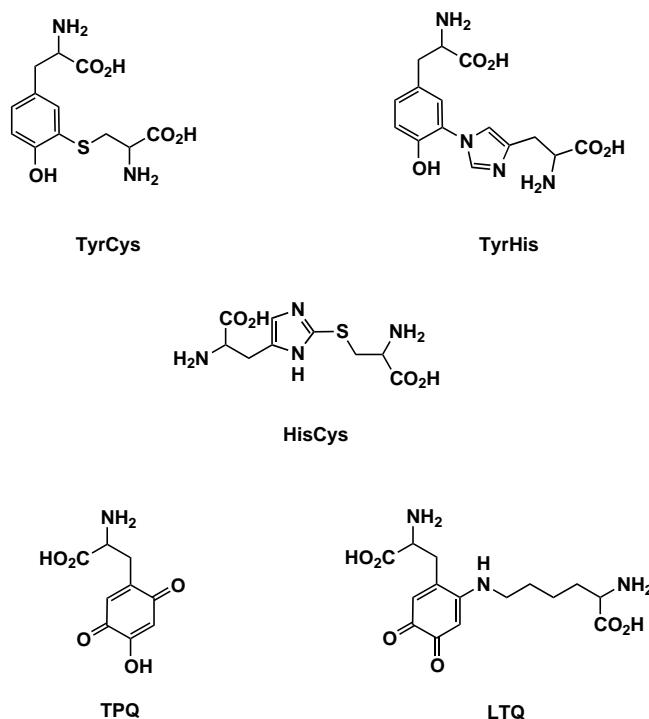


- Toronto, 1997; c) *Combinatorial Peptides and Nonpeptide Libraries—A Handbook* (Ed.: G. Jung), VCH, New York, 1996.
- [3] S. L. Schreiber, *Science* **2000**, 287, 1964.
- [4] S. L. Schreiber, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 1127.
- [5] a) D. S. Tan, M. A. Foley, M. D. Shair, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 8565; b) D. S. Tan, M. A. Foley, B. R. Stockwell, M. D. Shair, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9073, zit. Lit.
- [6] a) Unveröffentlichte Ergebnisse von Schreiber et al.; b) J. Carcamo, A. Zentella, J. Massague, *Mol. Cell. Biol.* **1995**, 15, 1573; c) B. R. Stockwell, S. L. Schreiber, *Curr. Biol.* **1998**, 8, 761.
- [7] D. Lee, J. Sello, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 10648.
- [8] R. H. Grubbs, S. Chang, *Tetrahedron* **1998**, 54, 4413.
- [9] P. Cohen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 459.
- [10] T. M. Sielecki, J. F. Boylan, P. A. Benfield, G. L. Tranier, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 1.
- [11] a) M. T. Fiorini, C. Abell, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 1827; b) N. S. Gray, S. Kwon, P. G. Schultz, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 1161; c) N. S. Gray, L. Wodicka, A.-M. W. H. Thunnissen, T. C. Norman, S. Kwon, H. Espinoza, D. O. Morgan, G. Barnes, S. LeClerc, L. Meijer, S.-H. Kim, D. J. Lockhart, P. G. Schultz, *Science* **1998**, 281, 533; d) M. Legraverend, O. Ludwig, E. Bisagni, S. LeClerc, L. Meijer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 793; e) T. C. Norman, N. S. Gray, J. T. Koh, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7430; f) S. R. Schow, R. L. Mackman, C. L. Blum, E. Brooks, A. G. Horsma, A. Joly, S. S. Kerwar, G. Lee, D. Schiffman, M. G. Nelson, X. Wang, M. M. Wick, X. Zhang, R. T. Lum, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 2697; g) D. A. Nugiel, L. A. M. Cornelius, J. W. Corbett, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 201.
- [12] a) U. Schulze-Gahmen, J. Branden, H. D. Jones, D. O. Morgan, L. Meijer, J. Vesely, S.-H. Kim, *Protein Struct. Funct. Genet.* **1995**, 22, 378; b) W. F. De Azevedo, Jr., H.-J. Mueller-Dieckmann, U. Schulze-Gahmen, P. J. Worland, E. Sausville, S.-H. Kim, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 2735.
- [13] Y.-T. Chang, N. S. Gray, G. R. Rosania, D. P. Sutherlin, S. Kwon, T. C. Norman, R. Sarohia, M. Leost, L. Meijer, P. G. Schultz, *Chem. Biol.* **1999**, 6, 361.
- [14] G. R. Rosania, Y.-T. Chang, O. Perez, D. Sutherlin, H. Dong, D. J. Lockhart, P. G. Schultz, *Nat. Biotechnol.* **2000**, 18, 304.
- [15] J. I. Armstrong, A. R. Portley, Y.-T. Chang, D. M. Nierengarten, B. N. Cook, K. G. Bowman, A. Bishop, N. S. Gray, K. M. Shokat, P. G. Schultz, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 1359; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1303.
- [16] a) K. C. Nicolaou, J. A. Pfefferkorn, G.-Q. Cao, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 750; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 734; b) K. C. Nicolaou, G.-Q. Cao, J. A. Pfefferkorn, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 755; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 739; c) K. C. Nicolaou, A. J. Roecker, J. A. Pfefferkorn, G.-Q. Cao, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2966.
- [17] C. W. Lindsley, L. K. Chan, B. C. Goess, R. Joseph, M. D. Shair, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 422.
- [18] O. L. Chapman, M. R. Engel, J. P. Springer, J. C. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 6696.

Chemisch modifizierte Aminosäuren in O₂-bindenden oder -aktivierenden Kupferproteinen**

Malcolm A. Halcrow*

Es ist eine interessante Beobachtung, dass vier der sechs Klassen von Kupferoxidasen und Monoxygenasen, deren Strukturen bekannt sind,^[1-3] eine chemisch modifizierte Aminosäure enthalten, die als Ligand entweder direkt an das aktive, Kupfer-haltige Zentrum gebunden ist oder sich in geringer Entfernung davon befindet. Einige dieser ungewöhnlichen Reste wie die TyrCys-, HisCys- und TyrHis-Einheiten entstammen einer Quervernetzungsreaktion zwischen zwei Aminosäureseitenketten. Die Cofaktoren 2,4,5-Trihydroxyphenylalaninchinon (Topachinon, TPQ) und Lysyltyrosylchinon (LTQ) werden dagegen durch Monoxygenierung eines Tyrosinrestes in der Seitenkette mit nachfolgendem nucleophilem Angriff an das resultierende *ortho*-Chinon erzeugt. Es ist zwischen 9 und 18 Jahre her, dass die HisCys-,^[4] TyrCys-^[5] und TPQ-Reste^[6] erstmals in ihren entsprechenden Proteinen entdeckt wurden. Trotzdem ist unser Verständnis



[*] Dr. M. A. Halcrow
School of Chemistry
University of Leeds
Woodhouse Lane, Leeds LS2 9JT (Großbritannien)
Fax: (+44) 113-233-6565
E-mail: M.A.Halcrow@chem.leeds.ac.uk

[**] Der Autor dankt der Royal Society (London) für ein Stipendium.

der funktionellen Rolle, die diese und andere, erst später entdeckte,^[7, 8] modifizierte Aminosäuren spielen, recht begrenzt. Die Aufmerksamkeit konzentriert sich nun auch auf die Biosynthese dieser Cofaktoren, da daran in vielen Fällen ungewöhnliche organische Umwandlungen beteiligt sein müssen, die bisher in der Biochemie des Kupfers unbekannt sind.

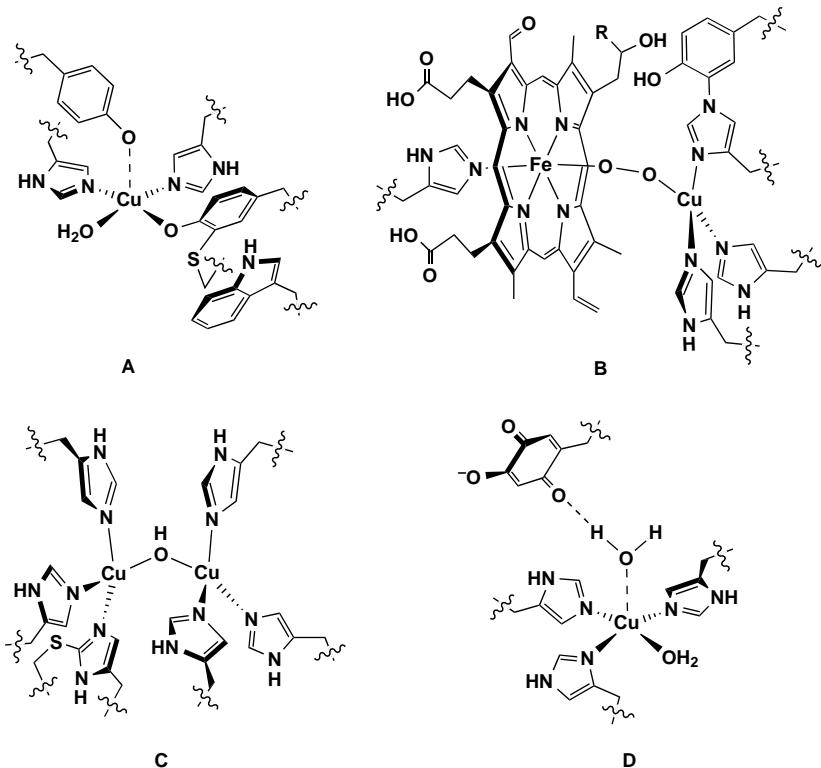
Unter den quervernetzenden Aminosäureresten ist TyrCys derjenige, dessen Funktion am besten bekannt ist. Dieser Rest kommt in radikalischen Kupferoxididasen vor, deren Prototyp die Galactose-Oxidase (GO) ist.^[1] Diese Seitenkette dient als Ligand für das Kupfer im aktiven Zentrum des Enzyms (Schema 1A)^[5] und wird im aktivierten Wartezustand des Enzyms zu einem [TyrCys]^{•+}-Radikal oxidiert; dieses Phenoxy-Radikal nimmt während der katalytischen Umsetzung ein Wasserstoffatom vom Alkoholsubstrat auf.^[1] Das Oxidationspotential der TyrCys-Einheit ist 0.5 V weniger positiv als man es für einen unmodifizierten Tyrosinrest erwarten würde.^[9] Mehrere Modellstudien haben in Einklang damit gezeigt, dass eine *ortho*-Sulfanyl-Substitution eines freien oder koordinierten Phenoxids dessen Oxidationspotential um 250–500 mV verringert.^[10] Jedoch haben aktuelle Berechnungen gezeigt, dass die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des ungepaarten Elektrons am S-Atom eines *ortho*-Sulfanyl-substituierten Phenoxyls maximal 15 % beträgt und die Spinverteilung über den Rest des Moleküls nicht signifikant verändert wird.^[11] Weiterhin wurde berechnet, dass die Energie für die homolytische O-H-Bindungsspaltung (Bindungsdissoziationsenergie BDE) eines *ortho*-Sulfanyl-substituierten Phenols mit dem eines ansonsten identischen Phenols ohne diesen Substituenten innerhalb einer Toleranz von

2 kcal mol⁻¹ identisch ist.^[12] Demnach stört der Sulfanyl-Substituent weder die elektronische Struktur des [TyrCys]^{•+}-Radikals von GO noch dessen Reaktivität gegenüber Wasserstoffatomdonoren in signifikanten Ausmaß. Die Funktion dieser Quervernetzung scheint nur im Absenken des Oxidationspotentials des oxidierbaren Tyrosinrings zu liegen.

Über die anderen quervernetzten Aminosäuren ist weniger bekannt. Die TyrHis-Quervernetzung in der Cytochrom-c-Oxidase (CcO) bildet einen Teil des Häm/Kupfer-Zentrums des Enzyms (Schema 1B),^[7] das die Reduktion von Disauerstoff zu Wasser katalysiert.^[3] Nach dem gegenwärtig favorisierten Reaktionsmechanismus erfolgt dabei die Vierelektronenreduktion von O₂ durch CcO in einem Schritt.^[13] Man nimmt an, dass der TyrHis-Rest während dieses Prozesses sowohl als Brønsted-Base als auch als Wasserstoffatomdonor für das Substratmolekül O₂ dient.^[14] Eine Modellstudie hat jedoch gezeigt, dass der Imidazol-1-yl-Substituent das Oxidationspotential der TyrHis-Seitenkette um < 100 mV absenken sollte, während die BDE für die homolytische O-H-Bindungsspaltung kaum beeinflusst wird.^[15] Somit ist unklar, wie die TyrHis-Quervernetzung die angenommene Radikalchemie dieses Restes begünstigen kann.

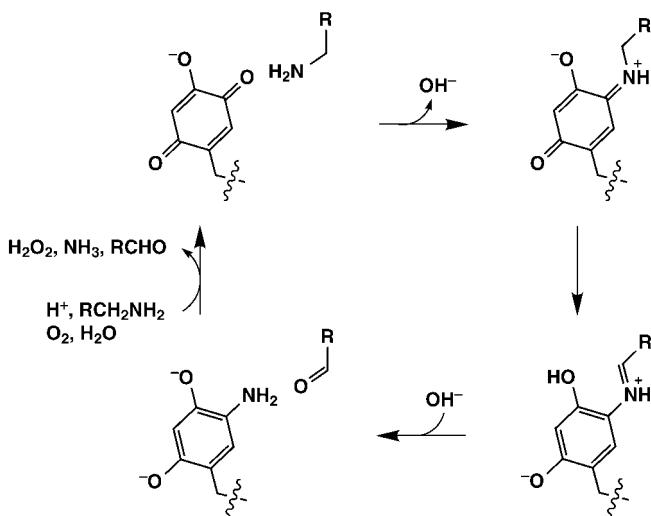
Die HisCys-Seitenkette ist ein Ligand vieler Kupferproteine vom Typ 3^[2] und wurde in einer Catechol-Oxidase und einem Hämocyanin aus Mollusken kristallographisch charakterisiert (Schema 1C).^[16] Es gibt keine Modellstudien bezüglich der Eigenschaften des HisCys-Restes, welcher weder während der Substratbindung noch beim Katalysecyclus dieser Proteine oxidiert wird.^[2] Da aber andere Hämocyanine bekannt sind, die keine quervernetzte Histidin-Seitenkette enthalten,^[17] wurde vorgeschlagen, dass die HisCys-Quervernetzung nur zur Erhöhung der Konformationsstabilität des koordinierten Cu-Ions dient.^[16]

Die Biosynthese der quervernetzten Aminosäuren wurde bisher nur wenig untersucht. Kürzlich wurde berichtet, dass frisch hergestellte GO als Kupfer-freies Protein in das Medium abgegeben wird. Diesem Protein fehlt die TyrCys-Quervernetzung, und es trägt ein 17mer als N-terminale Verlängerung, die während der Reifung des Polypeptids abgespalten wird.^[18] Die Bildung des TyrCys-Restes ist selbstprozessiv und hängt sowohl von Kupfer als auch von O₂ ab.^[18] Die Zugabe von CuSO₄ zu Pro-GO liefert zuerst eine Spezies, die eine Tyr → Cu-Ligand-Metall-Charge-Transfer-Bande (LMCT, Ligand-Metall-Charge-Transfer) bei 410 nm und eine *d-d*-Absorption bei 750 nm zeigt.^[18] Diese können einem tetragonalen Cu^{II}/Tyrosinat-Komplex zugeordnet werden, in dem sich die TyrCys-Quervernetzung vermutlich noch nicht gebildet hat. Innerhalb von 1 h wird diese Spezies bei 298 K ohne beobachtbare Zwischenstufe aerob in eine aktive, oxidierte GO umgewandelt. Weitere Details dazu sind jedoch nicht bekannt.



Schema 1. Strukturen der aktiven Zentren von Kupferoxididasen, die modifizierte Aminosäurereste enthalten: A) Galactose-Oxidase;^[5] B) Catechol-Oxidase;^[16] C) das O₂-Reduktionszentrum von Cytochrom-c-Oxidase;^[7] D) Kupfer-haltige Aminoxidase.^[19–21]

Im Gegensatz zu den TyrCys-, HisCys- und TyrHis-Resten ist der TPQ-Cofaktor in aktiver Kupfer-haltiger Aminoxidase (CAO) nicht direkt an das Kupfer-Ion koordiniert, sondern befindet sich ungefähr 5 Å von einem $[\text{Cu}(\text{His})_3(\text{H}_2\text{O})_x]$ -Zentrum ($x=1, 2$) entfernt (Schema 1D).^[19-21] Die Substrat-oxidation findet am TPQ-Ring nach einem gut bekannten Transaminierungsmechanismus statt. Dieser umfasst einen nucleophilen Angriff der Aminogruppe des Substrats auf die C-5-Carbonylgruppe von TPQ, eine nachfolgende Isomerisierung sowie die Hydrolyse der resultierenden Schiff-Base (Schema 2).^[1] Der reduzierte Aminochinol-Cofaktor wird dann durch molekularen Sauerstoff reoxidiert, möglicherweise über einen Elektronentransfer zum Kupfer-Ion, obwohl letzteres nicht eindeutig gezeigt wurde.



Schema 2. Mechanismus der Aminoxidation durch den TPQ-Cofaktor in Kupfer-haltiger Aminoxidase.^[1]

Die Synthese des TPQ-Cofaktors CAO^[22] ist wie des GO-Cofaktors selbstprozessiv und erfolgt mit der in Gleichung (1)



gezeigten Stöchiometrie.^[23] Die aerobe Inkubation von Pro-CAO mit Cu^{II} liefert zuerst zwei Spezies, die Tyr → Cu-LMCT-Absorptionen bei 350 und 380 nm zeigen und mit ähnlicher Geschwindigkeit zerfallen.^[24] Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass die bei 380 nm absorbierende Spezies Cu^{II} enthält^[25], welches eine Komplexbindung mit Aminosäuren außerhalb des aktiven Zentrums eingeht und für die Cofaktor-Synthese nicht von Bedeutung ist.^[24] Dagegen entsteht TPQ aus der anderen Zwischenstufe mit einer Kinetik erster Ordnung^[24] bei gleichzeitiger Aufnahme einer äquimolaren Menge O₂.^[26] Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der TPQ-Synthese ist die Reaktion der bei 350 nm absorbierenden Zwischenstufe mit O₂. Daran ist kein Protonentransfer beteiligt.^[26]

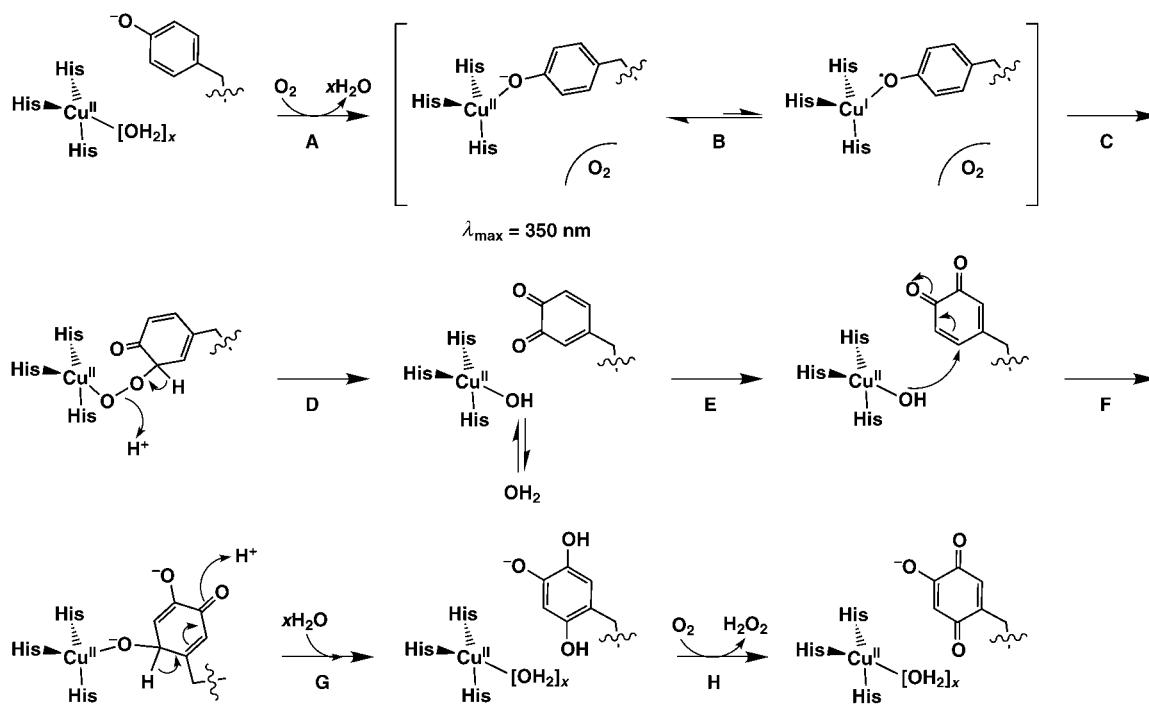
Die Zwischenstufe in der TPQ-Biogenese mit der LMCT-Bande bei 350 nm enthält vermutlich ein aktives Zentrum mit einem tetraedrischen $[\text{Cu}(\text{His})_3(\text{Tyr})]$ -Komplex.^[24] Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass die Kristallstrukturanalyse einer noch nicht prozessierten, bakteriellen CAO, die Zink anstelle von Kupfer enthält, ein isoelektronisches, tetraedrisches $[\text{Zn}(\text{His})_3(\text{Tyr})]^{+}$ -Zentrum ergab, in dem ein unmodifi-

ziertes Tyrosin-Cofaktor als Ligand an das Zn-Ion gebunden ist.^[27] Interessanterweise erhält man die bei 350 nm absorbierende Spezies nicht, wenn Pro-CAO mit Cu anaerob inkubiert wird, obwohl kein O₂ bei der aeroben Bildung verbraucht wird.^[24] Da es keinen Beweis für eine Cu-O₂-Bindung in dieser Spezies gibt, wurde vorgeschlagen, dass es eine vom Cu-Ion entfernte Bindungsstelle für den Sauerstoff gibt und dass die Besetzung dieser Stelle eine Konformationsänderung induziert, die den Tyr-Rest zur Koordination zwingt.

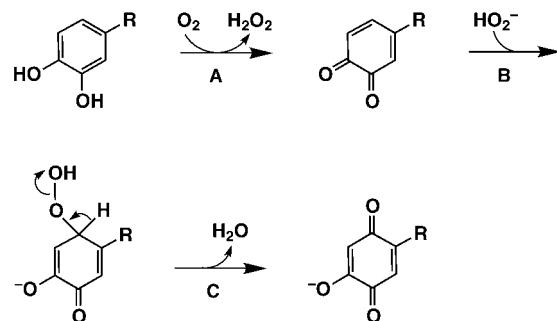
Basierend auf diesen Messungen wurde der in Schema 3 gezeigte Mechanismus für die TPQ-Biogenese aufgestellt.^[26] Diesen Mechanismus kann man in zwei Stufen aufteilen: die Monooxygenierung von Tyrosin unter Bildung von 3,4-Dihydroxyphenylalaninchinon (DPQ; Schritte A–D) und die Hydroxylierung sowie Oxidation des resultierenden Chinons (Schritte F–H). Schritt B der Monooxygenierung, d.h. ein intramolekularer Elektronentransfer, der einen Cu^{II}/Phenoxid-Komplex in eine Cu^I/Phenoxy-Spezies überführt, wurde erst vor kurzem chemisch modelliert.^[28] Das so gebildete Tyrosyl-Radikal müsste dann vom Cu-Ion verdrängt werden, um die Bindung von O₂ an das Cu-Zentrum zu ermöglichen (Schritt C). Für den resultierenden Arylperoxy-Komplex gibt es zwar kein Modellbeispiel in der Kupfer-Sauerstoff-Chemie, er erinnert aber an den Start-Hydroxylierungsschritt in Catechol-Dioxigenasen, der durch ein mit einem Eisen-Ion besetztes Zentrum bewirkt wird.^[29] Diese Spezies ähnelt strukturell dem kristallographisch charakterisierten Turnover-Komplex aus Substrat und reduzierter CAO mit O₂, in dem das Cu-Ion und der Cofakterring durch ein einzähniges O₂-Moleköl verbrückt sind.^[21] Demnach sollte der angenommene Arylperoxy-Komplex in Schema 3 im aktiven Zentrum von CAO sterisch möglich sein.

Eine Resonanz-Raman-Untersuchung ergab, dass das O-Atom an der C-2-Position von TPQ aus H₂O stammt und nicht aus O₂.^[30] Da nach Modellstudien DPQ bei neutralem pH-Wert in wässriger Lösung nicht 1,4-hydrolysiert wird,^[31, 32] wäre ein Wassermoleköl im aktiven Zentrum von CAO nicht basisch genug, um den DPQ-Ring anzugreifen. Durch die Koordination des Wassermoleküls an ein Cu^{II}-Ion als Lewis-Säure könnte es ausreichend acide für eine Deprotonierung werden, und danach wie in Schritt F in Schema 3 gezeigt reagieren. Es sollte jedoch erwähnt werden, dass für den an mehreren Stellen des Mechanismus vorgeschlagenen Angriff eines Cu-gebundenen Nucleophils an die C-2- und C-5-Position der Vorläufer-Tyrosinseitenkette eine Rotation des DPQ-Rings um seinen Methylen-substituenten um ungefähr 180° (Schritt E in Schema 3) erfolgen müsste. Außerdem müssen die Schritte E und F zusammen im Vergleich zum Austausch des Cu-gebundenen Hydroxidions mit dem umgebenden Wasser langsam ablaufen, um den Einbau eines O-Atoms aus Wasser in das Endprodukt zu ermöglichen.

Es sind keine Beispiele für eine Monooxygenierung von Phenol durch synthetische, einkernige Kupferkomplexe bekannt. Die Schritte F–H von Schema 3 wurden jedoch durch die wässrige Autoxidation von 4-Alkylcatecholen zu 2-Alkyl-5-hydroxybenzochinonen modelliert (Schema 4). Diese Reaktion erfolgt bei Raumtemperatur und Standarddruck langsam, wird aber durch Cu^{II}-Ionen katalysiert.^[32, 33] Der Katalysator erhöht die Geschwindigkeit der Oxidation der Ca-



Schema 3. Der von Klinman et al.^[26] vorgeschlagene Mechanismus für die TPQ-Biosynthese.



Schema 4. Mechanismus der aeroben Catechol-Autoxidation in vitro.^[34]

techol-Vorstufe erheblich (Schritt A in Schema 4),^[32, 33] scheint aber die anderen Reaktionsschritte nicht zu beeinflussen.^[32] Die Geschwindigkeit der Umwandlung der *ortho*-Chinone in die Hydroxybenzochinone (Schritte B und C in Schema 4) erhöht sich zwar bei höheren pH-Werten, nicht aber bei Zusatz von Cu^{II}-Salzen. Analog zu dem in Schema 3 gezeigten Mechanismus wurde dies als Anhaltspunkt dafür gesehen, dass das aktive Nucleophil in dieser Reaktion ein freies und kein Cu-gebundenen Hydroxidion ist.^[32] Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass das O-Atom in der C-2-Position unter diesen Bedingungen aus einer konjugierten Addition von H₂O₂ stammt, welches als Nebenprodukt der Catecholoxidation entsteht (Schema 4).^[34] Dass HO₂⁻ in vitro leichter als OH⁻ angreift, kann auf den geringeren pK_a-Wert von H₂O₂ im Vergleich zu H₂O zurückgeführt werden.

Diese Ergebnisse bedeuten, dass die lokale Umgebung des aktiven Zentrums von CAO die Chemie der *ortho*-Chinon-Hydratisierung gegenüber der in vitro verändert hat. Dieses Beispiel erschwert die Vorhersage eines detaillierten Mechanismus für die Biosynthese der TyrCys-, HisCys- oder TyrHis-Einheiten. Für alle drei dieser Quervernetzungsreaktionen

konnten sehr ähnliche Analogreaktionen im Labor durchgeführt werden, allerdings mit Methoden, die wahrscheinlich biochemisch nicht von Bedeutung sind.^[15, 35] Es wird also spannend sein herauszufinden, wie die Natur Wege entwickelt hat, um nucleophile Phenol- und Imidazolringe mit nicht elektrophilen Thiol- oder Imidazolzentren unter aeroben natürlichen Bedingungen zu koppeln.

- [1] J. P. Klinman, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2541–2561.
- [2] E. I. Solomon, U. M. Sundaram, T. E. Machonkin, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2563–2605.
- [3] S. Ferguson-Miller, G. T. Babcock, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2889–2907.
- [4] K. Lerch, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 6414–6419.
- [5] N. Ito, S. E. V. Phillips, C. Stevens, Z. B. Ogel, M. J. McPherson, J. N. Keen, K. D. S. Yadav, P. F. Knowles, *Nature* **1991**, *350*, 87–90.
- [6] S. M. Janes, D. Mu, D. Wemmer, A. J. Smith, S. Kaur, D. Maltby, A. L. Burlingame, J. P. Klinman, *Science* **1990**, *248*, 981–987.
- [7] C. Ostermeier, A. Harrela, U. Ermler, H. Michel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10547–10553; S. Yoshikawa, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, E. Yamashita, N. Inoue, M. Yao, M. J. Fei, C. P. Libeu, T. Mizushima, H. Yamaguchi, T. Tomazaki, T. Tsukihara, *Science* **1998**, *280*, 1723–1729.
- [8] S. X. Wang, M. Murae, K. F. Medzihradzky, A. L. Burlingame, D. E. Brown, D. M. Dooley, A. J. Smith, H. M. Kagan, J. P. Klinman, *Science* **1996**, *273*, 1078–1084.
- [9] J. M. Johnson, H. B. Halsall, W. R. Heineman, *Biochemistry* **1985**, *24*, 1579–1585.
- [10] J. A. Halfen, B. A. Jadzdzewski, S. Mahaptara, L. M. Berreau, E. C. Wilkinson, L. Que, Jr., W. B. Tolman, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8217–8227; S. Itoh, S. Takayama, R. Arakawa, A. Furuta, M. Komatsu, A. Ishida, S. Takamuku, S. Fukuzumi, *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 1407–1416; M. A. Halcrow, L. M. L. Chia, X. Liu, E. J. L. McInnes, L. J. Yellowlees, F. E. Mabbs, I. J. Scowen, M. McPartlin, J. E. Davies, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1999**, 1753–1762.
- [11] K. E. Wise, J. B. Pate, R. A. Wheeler, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 4764–4772; F. Himo, G. T. Babcock, L. A. Eriksson, *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *313*, 374–378.
- [12] F. Himo, L. A. Eriksson, M. A. Blomberg, P. E. M. Siegbahn, *Int. J. Quantum Chem.* **2000**, *76*, 714–723.

- [13] S. Paula, A. Sucheta, I. Szundi, O. Einarsdóttir, *Biochemistry* **1999**, *38*, 3025–3033.
- [14] D. A. Proshlyakov, M. A. Pressler, G. T. Babcock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 8020–8025; F. MacMillan, A. Kannt, J. Behr, T. Prisner, H. Michel, *Biochemistry* **1999**, *38*, 9179–9184.
- [15] K. M. McCauley, J. M. Vrtis, J. Dupont, W. A. van der Donk, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2403–2404.
- [16] M. E. Cuff, K. I. Miller, K. E. van Holde, W. A. Hendrickson, *J. Mol. Biol.* **1998**, *278*, 855–870; T. Klabunde, C. Eicken, J. C. Sacchettini, B. Krebs, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 1084–1090.
- [17] K. A. Magnus, H. Ton-That, J. E. Carpenter, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 727–735.
- [18] M. S. Rogers, A. J. Baron, M. J. McPherson, P. F. Knowles, D. M. Dooley, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 990–991.
- [19] M. R. Parsons, M. A. Convery, C. M. Wilmut, K. D. S. Yadav, V. Blakeley, A. S. Corner, S. E. V. Phillips, M. J. McPherson, P. F. Knowles, *Structure* **1995**, *3*, 1171–1184; V. Kumar, D. M. Dooley, H. C. Freeman, J. M. Guss, I. Harvey, M. A. McGuirl, M. J. C. Wilce, V. M. Zubak, *Structure* **1996**, *4*, 943–955; R. Li, J. P. Klinman, F. S. Mathews, *Structure* **1998**, *6*, 293–307.
- [20] M. C. J. Wilce, D. M. Dooley, H. C. Freeman, J. M. Guss, H. Matsunami, W. S. McIntire, C. E. Ruggiero, K. Tanizawa, H. Yamaguchi, *Biochemistry* **1997**, *36*, 16116–16133.
- [21] C. M. Wilmut, J. Hadju, M. J. McPherson, P. F. Knowles, S. E. V. Phillips, *Science* **1999**, *286*, 1724–1728.
- [22] D. M. Dooley, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, *4*, 1–11.
- [23] C. E. Ruggiero, D. M. Dooley, *Biochemistry* **1999**, *38*, 2892–2898.
- [24] J. E. Dove, B. Schwartz, N. K. Williams, J. P. Klinman, *Biochemistry* **2000**, *39*, 3690–3698.
- [25] C. E. Ruggiero, J. A. Smith, K. Tanizawa, D. M. Dooley, *Biochemistry* **1997**, *36*, 1953–1959.
- [26] B. Schwartz, J. E. Dove, J. P. Klinman, *Biochemistry* **2000**, *39*, 3699–3707.
- [27] Z.-W. Chen, B. Schwartz, N. K. Williams, R. Li, J. P. Klinman, F. S. Mathews, *Biochemistry* **2000**, *39*, 9709–9717.
- [28] K. Fujisawa, Y. Iwata, N. Kitajima, H. Higashimura, M. Kubota, Y. Miyashita, Y. Yamada, K. Okamoto, Y. Moro-oka, *Chem. Lett.* **1999**, *739*–740.
- [29] L. Que, Jr., R. Y. N. Ho, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2607–2624.
- [30] N. Nakamura, R. Matsuzaki, Y.-H. Choi, K. Tanizawa, J. Sanders-Lohr, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 4718–4724.
- [31] M. Mure, J. P. Klinman, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7117–7127; A. C. Rinaldi, A. Rescigno, F. Sollai, G. Soddu, N. Curreli, A. Rinaldi, A. Finazzi-Agrò, E. Sanjust, *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1996**, *40*, 189–197.
- [32] A. C. Rinaldi, C. M. Porcu, S. Oliva, N. Curreli, A. Rescigno, F. Sollai, A. Rinaldi, A. Finazzi-Agrò, E. Sanjust, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *251*, 91–97.
- [33] A. C. Rinaldi, C. M. Porcu, N. Curreli, A. Rescigno, A. Finazzi-Agrò, J. Z. Pedersen, A. Rinaldi, E. Sanjust, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *214*, 559–567.
- [34] S. Mandal, Y. Lee, M. M. Purdy, L. M. Sayre, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3574–3584.
- [35] D. Evans, M. E. Cracknell, J. C. Saunders, C. E. Smaith, W. R. N. Williamson, W. Dawson, W. J. F. Sweatman, *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1321–1327; S. Ito, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3636–3638; Q. T. Do, D. Ellothmani, G. Le Guillanton, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4657–4658.