

Enzym auf etwa 8 abgesenkt. Eine essenzielle Glutamat-Seitenkette scheint in diesem Fall die Rolle der Base zur Abstraktion des aktivierten aliphatischen Protons zu spielen.^[1-3]

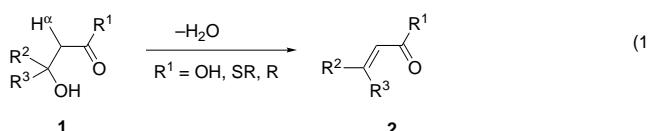
Einige Glutamat-fermentierende anaerobe Bakterien enthalten eine Dehydratase, die die reversible *syn*- α,β -Eliminierung von H_2O aus (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA (**3**) unter Bildung von (*E*)-Glutaconyl-CoA (**4**) katalysiert (Schema 1). In diesem Fall ist die zu spaltende C-H $^{\beta}$ -Bindung nicht aktiviert ($\text{p}K_{\text{S}} \approx 40$), und in der Rückreaktion addiert

Enzymkatalysemechanismen

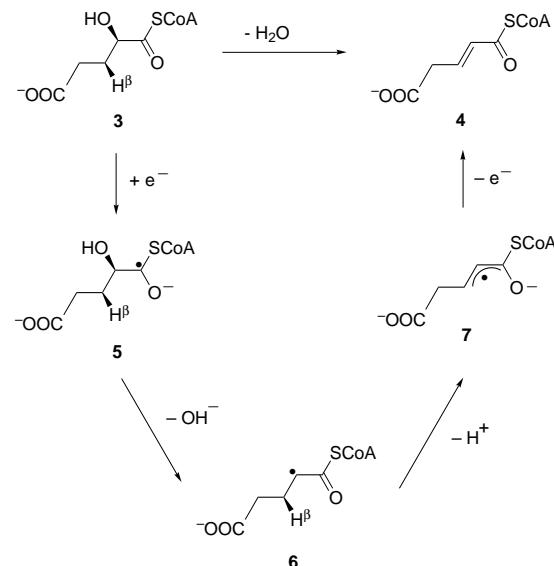
Deprotonierung von Enoxy-Radikalen: theoretische Bestätigung eines 50 Jahre alten Mechanismusvorschlags**

David M. Smith, Wolfgang Buckel und Hendrik Zipse*

Die Dehydratisierung oder α,β -Eliminierung von H_2O aus Biomolekülen ist eine häufig vorkommende enzymatische Reaktion. Fast alle Dehydrataseren katalysieren die Entfernung einer Hydroxygruppe in β -Stellung zu einer elektronenziehenden Carboxylat-, Thioester- oder Carbonylgruppe [Gl. (1)].



Die C-H $^{\alpha}$ -Bindung in Verbindungen des Typs **1** ist aktiviert und kann somit relativ leicht durch eine basische Seitengruppe eines Enzyms deprotoniert werden. In einem typischen Substrat wie 3-Hydroxybutyryl-CoA (**1** mit $\text{R}^1 = \text{SCoA}$, $\text{R}^2 = \text{CH}_3$, $\text{R}^3 = \text{H}$) weist die relevante C-H $^{\alpha}$ -Bindung einen $\text{p}K_{\text{S}}$ -Wert von etwa 21 in wässriger Lösung auf. Durch Bindung an die Enoyl-CoA-Hydratase (Crotonase) wird dieser $\text{p}K_{\text{S}}$ durch spezifische Wechselwirkungen mit dem



Schema 1. Vorgeschlagener Mechanismus für die reversible *syn*- α,β -Eliminierung von H_2O aus (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA (**3**).

die Hydroxygruppe an das elektronenreichere α -Kohlenstoffatom der polarisierten Doppelbindung. Um diese Beobachtungen zu erklären wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, demzufolge die Carbonylgruppe durch Einelektronenreduktion „umgepolt“ wird.^[4] Das dabei entstehende Ketylradikal-anion **5** (Schema 1) könnte die α -Hydroxygruppe unter Bildung des Enoxy-Radikals **6** abspalten. Deprotonierung (H^{β}) dieses Radikals ergäbe dann das Produkt-ähnliche Ketylradikal-anion **7**, dessen Oxidation zum Endprodukt **4** führt.^[5-7]

Die biochemische Analyse des aus zwei Komponenten bestehenden 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase-Systems der Darmbakterien *Acidaminococcus fermentans* und *Clostridium symbiosum* weist tatsächlich auf die Möglichkeit des in Schema 1 gezeigten Elektronentransfers hin.^[8-10] Die Komponente A von *A. fermentans* ist ein homodimeres Protein mit einem $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+2+}$ -Cluster zwischen den beiden Untereinheiten und überträgt unter ATP-Hydrolyse ein Elektron auf Komponente D, ein heterodimeres Protein, das Molybdän(vi), reduziertes Riboflavin-5'-phosphat (FMNH_2) und einen $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ -Cluster enthält. Dieser ATP-getriebene Elektronentransfer bewirkt die Bildung von Mo^{v} und erzeugt, wahrscheinlich nach Oxidation zu Mo^{vi} , das Ketylradikal-anion **5**. Oxidation des zweiten Ketylradikal-anions (**7**) führt wahrscheinlich zur Rückbildung von

[*] Prof. Dr. H. Zipse, Dr. D. M. Smith
Department Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität
Butenandtstraße 13, 82131 München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2180-77738
E-mail: zipse@cup.uni-muenchen.de

Prof. Dr. W. Buckel
Laboratorium für Mikrobiologie, Philipps-Universität
Karl-von-Frisch-Straße, 35032 Marburg (Deutschland)

[**] Diese Studie wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SPP „Radikale in der enzymatischen Katalyse“) unterstützt. H.Z. und W.B. danken dem Fonds der Chemischen Industrie für kontinuierliche Unterstützung, und D.M.S. dankt der Alexander-von-Humboldt-Stiftung für ein Forschungsstipendium. Weiterhin danken wir Prof. V. Barone für hilfreiche Diskussionen und technische Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

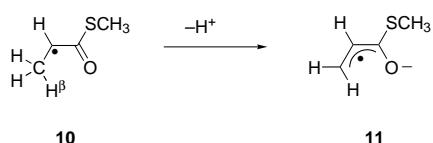
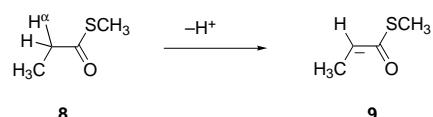
Mo^v, sodass ein einziger Elektronentransfer zwischen den beiden Komponenten viele katalytische Zyklen induziert.

2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase ist nicht das einzige Enzym, das die Spaltung einer nichtaktivierten C-H^β-Bindung katalysiert. So verläuft die Dehydratisierung von 4-Hydroxybutyryl-CoA zu Crotonyl-CoA, die durch einen [4Fe-4S]-Cluster und FAD-haltiges Enzym von *Clostridium aminobutyricum* katalysiert wird, ebenfalls über die Abspaltung eines Protons aus der β-Position eines Thioesters. In diesem Fall wurde die Bildung eines Enoxy-Radikals (ähnlich der Struktur **6** in Schema 1) durch Abstraktion des α-Wasserstoffatoms vorgeschlagen. Nachfolgende Deprotonierung des β-C-Atoms führt zum Ketylradikalanion von 4-Hydroxycrotonyl-CoA und Abspaltung der Hydroxygruppe dann zum Dienoxy-Radikal. Readdition des anfänglich abstrahierten Wasserstoffatoms an C-4 ergibt das Endprodukt Crotonyl-CoA.^[7]

Die Besonderheit der für beide Enzyme vorgeschlagenen Mechanismen besteht darin, dass die β-Deprotonierung auf der Stufe des Enoxy-Radikals (z. B. **6**), und nicht des Substrats selbst (z. B. **3**) erfolgt. Vor fast 50 Jahren schlug Sir John W. Cornforth vor, dass Enoxy-Radikale (gebildet durch α-H-Abstraktion wie für die Dehydratisierung von 4-Hydroxybutyryl-CoA vorgeschlagen) eine besonders einfache Deprotonierung zu einem Ketylradikalanion eingehen könnten.^[11] Dieser Vorschlag wurde seither jedoch weder durch experimentelle noch theoretische Daten untermauert. Hier versuchen wir deshalb, die Acidität in der β-Position eines Enoxy-Radikals zu quantifizieren. Dadurch sollte sich entscheiden lassen, ob die Acidität des Radikals im Vergleich zu geschlossenschaligen Thioestern hinreichend erhöht ist, um die Deprotonierung der unaktivierten Position zu erklären, oder ob andere Faktoren berücksichtigt werden müssen.

Die Aciditäten einfacher Thioester wurden experimentell von Richard et al. in D₂O bei 25 °C untersucht; für Methylthioacetat wurde ein pK_S-Wert von +21 ± 0.5 bestimmt.^[15] Sehr viel niedrigere Werte wurden von Ghisla et al. für substituierte Phenylacetyl-CoA-Derivate auf der Basis gemessener Werte analog substituierter Phenylaceton-Derivate abgeschätzt.^[16] Der geschätzte pK_S-Wert von 4-Nitrophenylacetyl-CoA beträgt +13.6. Die direkte Bestimmung der pK_S-Werte wird durch die vermutlich auf die rasche Hydrolyse zurückzuführende kurze Lebensdauer der Phenylacetyl-CoA-Anionen in wässrig-basischer Lösung erschwert.

Die theoretische Vorhersage absoluter pK_S-Werte ist in den letzten Jahren durch die Entwicklung akkurate Konzentrations-Methode möglich geworden.^[12-14] Auch wenn die Genauigkeit dieses Ansatzes für Systeme mit protischen Wasserstoffatomen recht beeindruckend ist, wurde seine Anwendung auf C-H-acide offenschalige Systeme bisher noch nicht untersucht. Wir verwenden in dieser Studie deshalb eine indirekte Methode, in der wir die Acidität des Enoxy-Radikals mit den bekannten Werten des verwandten Thioesters vergleichen. Als Modellreaktion haben wir die α-Deprotonierung von Methylthiopropionat **8** (unter Bildung des Anions **9**) gewählt und diese mit der β-Deprotonierung des Propionat-Radikals **10** verglichen, bei der das Radikalanion von Methylthioacrylat (**11**) entsteht (Schema 2).



Schema 2. Modellsystem zur Berechnung der pK_S-Werte.

Abbildung 1 zeigt die B3LYP/aug-cc-pVDZ-optimierten Strukturen von **8-11**. Während die neutralen Thioester **8** und **10** relativ kleine C-S-Abstände aufweisen, wie sie für eine typische C-S-Einfachbindung zu erwarten sind, sind die C-S-Abstände in den deprotonierten Systemen **9** und **11** weitaus größer. Besonders deutlich ist dies in **9** mit einem C-S-

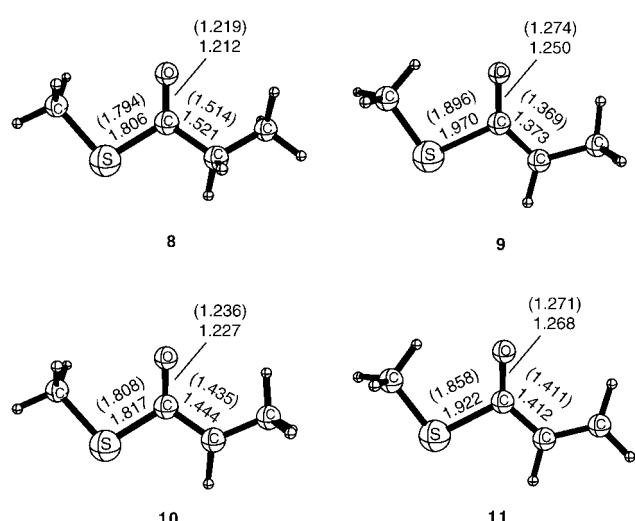


Abbildung 1. Strukturen der Thioester **8-11** (Becke3LYP/aug-cc-pVDZ-Niveau). Angaben in Klammern wurden nach Optimierung mit dem CPCM-Modell für wässrige Lösungen erhalten.

Abstand von 1.97 Å. Wie ein Vergleich der Schwefel-Partialladungen der neutralen Systeme (+0.18 e in **8** und +0.20 e in **10**) und der anionischen Systeme (-0.07 e in **9** und -0.02 e in **11**) verdeutlicht, ist diese Bindungsverlängerung zumindest teilweise auf die Ladungsverschiebung vom Acylfragment auf das Schwefelatom zurückzuführen. Die negative Partialladung des Schwefelatoms und die verlängerte C-S-Bindung weisen darauf hin, dass die kurze Lebensdauer der Methylthioacetyl-Anionen in wässriger Lösung durchaus auf die rasche Abspaltung von Methylthiolat-Anionen zurückzuführen sein könnte.

Deprotonierung führt weiterhin zu einer Verkürzung der Bindung zwischen dem Carbonyl-C-Atom und dem α-C-Atom. Am deutlichsten zu erkennen ist dies im geschlossenschaligen System mit C-C-Abständen von 1.52 Å in **8** und nur 1.37 Å in **9**. Demgegenüber ist die Bindungsverkürzung in

den offenschaligen Systemen **10** und **11** sehr viel geringer. Die strukturellen Änderungen werden von einer Zunahme der Elektronendichte an den α -C-Atomen begleitet, die in **8** und **10** mit Partialladungen von -0.03 e und $+0.09$ e nahezu neutral, in den Anionen **9** und **11** aber mit Werten von -0.35 e und -0.22 e deutlich negativ sind. Diese Deprotonierungs-induzierte Bindungsverkürzung kann als Konsequenz der Resonanzstabilisierung der sich bildenden negativen Ladung durch die benachbarte Carbonylgruppe verstanden werden. Die Veränderungen sind größer im Fall des stärker lokalisierten Systems **8** als im offenschaligen System **10**, in dem der C-C-Abstand bereits aufgrund der Resonanzstabilisierung des Radikalzentrums verkleinert ist.

Ein Großteil der ungepaarten Spindichte in **10** ist am α -C-Atom lokalisiert (NPA-Koeffizient 0.75) mit weiteren kleinen Beiträgen am Carbonylsauerstoffatom (0.18). Dies ist sicher in Übereinstimmung mit den Erwartungen für ein heteroallylisches Radikal wie **10**. In **11** ist die Spindichte etwas stärker delokalisiert mit Koeffizienten von 0.55 am terminalen β -C-Atom, 0.25 am Carbonylkohlenstoffatom und 0.17 am Carbonylsauerstoffatom. Dies spiegelt die LUMO-Struktur der zugrunde liegenden α,β -ungesättigten Carbonylverbindung wider.^[17] Die in Schema 2 angegebenen Lewis-Strukturen scheinen die Situation sowohl für **10** wie für **11** am besten wiederzugeben.

Die Gasphasendeprotonierung von Thioester **8** unter Bildung von Anion **9** und einem freien Proton ist stark endotherm (Tabelle 1). Die Nullpunktschwingungsenergie-

Tabelle 1: Freie Deprotonierungsenergien und Aciditätsdifferenzen zwischen **8** und **10**.^[a]

Niveau	9 – 8	11 – 10	$\Delta\Delta G$	ΔpK_s
Gasphase				
ΔG (B3LYPaug-cc-pVDZ)	+1472.2	+1424.4	47.8	8.4
ΔG (G3(MP2)(+)-RAD(p))	+1488.7	+1434.8	53.9	9.4
wässrige Lösung (implizites Modell) ^[b]				
ΔG (G3(MP2)(+)-RAD(p))	+149.6	+106.9	42.7	7.5
wässrige Lösung (explizites Modell) ^[c]				
ΔG (G3(MP2)(+)-RAD(p))		38.3	6.7	

[a] $\Delta\Delta G$ in kJ mol^{-1} , ΔpK_s -Werte sind dimensionslos; sämtliche Werte gelten für $T=298$ K. [b] Erhalten mit dem CPCM-Kontinuumsmodell, siehe Text. [c] Erhalten mit einem periodischen Kasten von 566 TIP3P-Wassermolekülen, siehe Text.

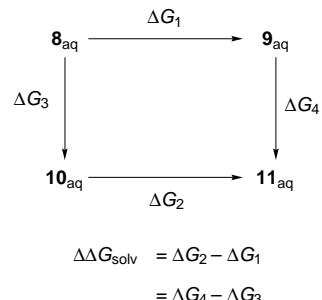
korrigierten relativen Energien bei 0 K, die Werte nach enthalpischen Korrekturen zu 298 K oder die Werte nach sowohl enthalpischen wie entropischen Korrekturen stimmen alle darin überein, dass das Radikal **10** etwa 50 kJ mol^{-1} acider ist als der geschlossenschalige Ester **8**. Aufgrund dieser Invarianz haben wir in Tabelle 1 nur die Differenz der Freien Energien angegeben. Die Kombination der verlässlicheren G3(MP2)(+)-RAD(p)-Energien mit thermochemischen Korrekturen (B3LYP/aug-cc-pVDZ) ergibt Freie-Energie-Werte, die etwa 6 kJ mol^{-1} größer sind als auf niedrigerem Niveau. Unsere beste Abschätzung der Differenz der Freien

Deprotonierungsenergie zwischen **8** und **10** beläuft sich somit auf 53.9 kJ mol^{-1} bei 298 K. Diese Energiedifferenz entspricht gemäß $\Delta G = -RT\ln K$ einer Erniedrigung des pK_s -Werts von **10** um 9.4 Einheiten relativ zu dem von **8**.

Zur Verwendung in wässriger Lösung müssen die Gasphasenwerte noch um Differenzen in den Freien Solvationsenergien korrigiert werden. Die Strukturen der Thioester **8**–**11** können durch Lösungsmittelleffekte eventuell stark verändert werden und wurden deshalb unter Verwendung der CPCM-Kontinuumsmethode neu optimiert. Der Strukturparameter, der durch die Anwesenheit des Lösungsmittelfeldes am stärksten beeinflusst wird, ist die C-S-Esterbindung in den Anionen **9** und **11** (Abbildung 1). Die meisten anderen Strukturparameter weisen nur kleinere Änderungen auf.

Die Analyse der durch den impliziten CPCM-Ansatz berechneten Freien Solvationsenergien zeigt, dass wässrige Solvation einen stärkeren Einfluss auf die Dissoziation von **8** als auf die von **10** hat. Dies scheint vorwiegend auf der besseren Solvation des lokalisierten Anions **9** gegenüber dem stärker delokalisierten Anion **11** zu beruhen. Die durch das CPCM-Modell vorhergesagte Aciditätsdifferenz ist deshalb geringer als in der Gasphase und beläuft sich auf 42.7 kJ mol^{-1} oder 7.5 pK_s -Einheiten bei 298 K.

Zusätzlich zum impliziten CPCM-Modell wurden die Differenzen der Freien Solvationsenergie mit einem expliziten Modell unter Verwendung eines periodischen Kastens mit 566 TIP3P-Wassermolekülen berechnet. Da die direkte Berechnung der bei Deprotonierungen auftretenden Ladungstrennung sehr schwierig ist, haben wir den in Schema 3 gezeigten thermodynamischen Kreisprozess ange-



Schema 3: Thermodynamischer Kreisprozess zur Verwendung mit dem expliziten Solvationsmodell.

wendet.^[18] Anstelle der direkten Berechnung der Solvationsenergiedifferenz ($\Delta G_2 - \Delta G_1$) kombinieren wir hier die Differenz der Solvationsenergien der beiden neutralen Systeme (**8** und **10**, ΔG_3) mit der der beiden anionischen Systeme (**9** und **11**, ΔG_4). Da die Freie Energie eine Zustandsfunktion ist, gilt die in Schema 3 unten gezeigte Gleichung, und wir erhalten eine korrekte Vorhersage für die relative Freie Solvationsenergie.

Die Verwendung des expliziten Lösungsmittelmodells stützt die vorherige Schlussfolgerung bezüglich der besseren Solvation von **9** gegenüber **11**. Weiterhin überzeugt die numerische Übereinstimmung der beiden Ansätze (implizit und explizit), wobei der explizite Ansatz eine Aciditätsdiffe-

renz zwischen **8** und **10** von 38.8 kJ mol^{-1} oder $6.7 \text{ p}K_s$ -Einheiten vorhersagt. Nach Berücksichtigung der mit den beiden Ansätzen verbundenen Ungenauigkeiten beträgt unsere beste Abschätzung für die $\text{p}K_s$ -Wert-Erniedrigung von **10** gegenüber **8** 7.1 ± 0.4 Einheiten. Unter der Annahme eines $\text{p}K_s$ -Werts von 21 ± 0.5 für die α -C-H-Gruppe von Thioester **8** in wässriger Lösung sagen wir somit einen $\text{p}K_s$ -Wert von 14 für die β -C-H-Gruppe in Radikal **10** voraus. Zwar kann eine Gruppe mit einem solchen $\text{p}K_s$ -Wert nicht als sonderlich acide gelten, aber es sollte berücksichtigt werden, dass der $\text{p}K_s$ -Wert des C-2-Protons von Thiamindiphosphat (12.7 ± 0.1)^[19] in einem ähnlichen Bereich liegt. In vielen enzymatischen Reaktionen agiert das Carbanion von Thiamindiphosphat als Nucleophil bei der Spaltung von C-C-Gruppen in Nachbarschaft zu einer Carbonylgruppe. Ein Beispiel hierfür ist die Decarboxylierung von Brenztraubensäure zu Acetaldehyd. Weiterhin sei darauf hingewiesen, dass die vorhergesagte Acidität der β -C-Position in **10** größer ist als die der α -C-Position typischer Hydrolase-Substrate wie etwa 3-Hydroxybutyryl-CoA. Wie in diesem letzten Beispiel wird ein Enzym aber sicher weitere stabilisierende Wechselwirkungen vorsehen müssen, um Enoxy-Radikale unter normalen physiologischen Bedingungen effizient zu deprotonieren.

Bedenkt man den $\text{p}K_s$ -Wert der β -C-Position in geschlossenschaligen Substraten wie **3** von etwa 40, so sagt unsere Abschätzung eine Radikal-induzierte Erniedrigung des $\text{p}K_s$ -Werts von über 25 Einheiten voraus! Dies übersteigt bei Weitem die bereits bekannte Radikal-induzierte $\text{p}K_s$ -Wert-Erniedrigung von Hydroxygruppen in aliphatischen Alkoholen.^[20] So erniedrigt sich der $\text{p}K_s$ -Wert der OH-Gruppen in Ethylenglycol durch Radikalbildung von ca. 17 auf 9.8. Dies entspricht einer Radikal-induzierten $\text{p}K_s$ -Verschiebung von „nur“ 7 Einheiten.

Wie bereits einleitend erwähnt, ist die 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase nicht das einzige Enzym, das die β -C-Position einer Carbonylverbindung in einem Radikalmechanismus aktiviert. Diese Tatsache zusammen mit der Größe der hier berechneten $\text{p}K_s$ -Wert-Verschiebung lässt darauf schließen, dass in der anaeroben Welt noch weitere Enzyme existieren, die sich der leichten Deprotonierbarkeit von Enoxy-Radikalen bedienen.^[19]

Experimentelles

Geometrieeoptimierungen wurden für alle vier Systeme (**8–11**) in der Gasphase auf dem Becke3LYP/aug-cc-pVDZ-Niveau durchgeführt.^[21,22] Nullpunktsschwingungsenergie und thermochemische Korrekturen wurden ebenfalls auf diesem Niveau berechnet. Ladungs- und Spindichteverteilungen wurden mit der Natural-Population-Analysis-(NPA)-Methode berechnet.^[23]

Verbesserte Energien wurden mit einer leicht modifizierten Version der G3(MP2)(+)-RAD(p)-Prozedur berechnet.^[24] Diese Methode ist eine Variante der G3(MP2)-Methode,^[25] in der anstelle einer UQCISD(T)/6-31G(d)- eine RCCSD(T)/6-31+G(d)-Einzel-punktberechnung durchgeführt wird, und der Einfluss der Basissatz-erweiterung mit der beschränkten (ROMP2) anstelle der unbeschränkten Störungstheorie zweiter Ordnung (UMP2) berechnet wird. Der einzige Unterschied zu dem in Lit. [24] beschriebenen Vorgehen besteht in der Verwendung von Becke3LYP/aug-cc-pVDZ-Geometrien und -Schwingungsfrequenzen.

Der Einfluss wässriger Solvation wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden abgeschätzt. Der erste (implizite) Ansatz verwendet die CPCM-Kontinuumsmethode in Kombination mit dem UAHF-Hohlraummodell auf dem Becke3LYP/aug-cc-pVDZ-Niveau.^[26] Um dem Einfluss Lösungsmittel-induzierter Strukturänderungen nachzugehen, wurden die Geometrien aller Systeme vor Berechnung der Solvationsenergien mit der CPCM-Methode optimiert. Im zweiten (expliziten) Ansatz wurde jedes Molekül in einem periodischen Kasten mit 566 TIP3P-Wassermolekülen^[27] umgeben und unter Anwendung der Thermodynamischen Integration^[28] die Differenz der Freien Solvationsenergie berechnet. Die CCSD(T)-Rechnungen wurden mit MOLPRO durchgeführt,^[29] die anderen quanten-chemischen und CPCM-Rechnungen mit Gaussian 98.^[30] Die Rechnungen zur expliziten Solvatisierung wurden mit AMBER^[31] durchgeführt.

Eingegangen am 7. November 2002 [Z50502]

Stichwörter: Ab-initio-Rechnungen · Acidität · C-H-Aktivierung · Emzymkatalyse · Radikale

- [1] B. J. Bahnson, V. E. Anderson, G. A. Petsko, *Biochemistry* **2002**, 41, 2621.
- [2] P. Willadsen, H. Eggerer, *Eur. J. Biochem.* **1975**, 54, 247.
- [3] B. J. Bahnson, V. E. Anderson, *Biochemistry* **1991**, 30, 5894.
- [4] W. Buckel, R. Keese, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 1595; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1502.
- [5] U. Müller, W. Buckel, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 230, 698.
- [6] W. Buckel, *FEBS Lett.* **1996**, 389, 20.
- [7] W. Buckel, B. T. Golding, *FEMS Microbiol. Rev.* **1999**, 22, 523.
- [8] M. Hans, J. Sievers, U. Müller, E. Bill, J. A. Vorholt, D. Linder, W. Buckel, *Eur. J. Biochem.* **1999**, 265, 404.
- [9] M. Hans, W. Buckel, E. Bill, *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 7082.
- [10] M. Hans, E. Bill, I. Cirpus, A. J. Pierik, M. Hetzel, D. Alber, W. Buckel, *Biochemistry* **2002**, 41, 5873.
- [11] J. W. Cornforth, *J. Lipid Res.* **1959**, 1, 3.
- [12] I. A. Topol, G. J. Tawa, S. K. Burt, A. A. Rashin, *J. Phys. Chem. A* **1997**, 101, 10075.
- [13] G. Schüürmann, M. Cossi, V. Barone, J. Tomasi, *J. Phys. Chem. A* **1998**, 102, 6706.
- [14] a) M. D. Liptak, G. C. Shields, *Int. J. Quantum Chem.* **2001**, 85, 727; b) A. M. Toth, M. D. Liptak, D. L. Phillips, G. C. Shields, *J. Chem. Phys.* **2001**, 114, 4595; c) M. D. Liptak, G. C. Shields, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 7314; d) M. D. Liptak, K. C. Gross, P. G. Seybold, S. Feldgus, G. C. Shields, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 6421.
- [15] T. L. Amyes, J. P. Richard, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10297.
- [16] P. Vock, S. Engst, M. Eder, S. Ghisla, *Biochemistry* **1998**, 37, 1848.
- [17] a) W. J. Jorgensen, L. Salem, *The Organic Chemist's Book of Orbitals*, Academic Press, San Diego, **1973**; b) T. Clark, R. Koch, *The Chemist's Electronic Book of Orbitals*, Springer, Heidelberg, **1999**.
- [18] a) W. L. Jorgensen, *Acc. Chem. Res.* **1989**, 22, 184; b) P. A. Kollman, *Chem. Rev.* **1993**, 93, 2395.
- [19] R. F. W. Hopmann, G. P. Brugnoni, *Nature New Biol.* **1973**, 246, 157.
- [20] a) K.-D. Asmus, A. Henglein, A. Wigger, G. Beck, *Ber. Bunsen-Ges.* **1966**, 70, 756; b) G. P. Laroff, R. W. Fessenden, *J. Phys. Chem.* **1973**, 77, 1283; c) S. Steenken, M. J. Davies, B. C. Gilbert, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1986**, 1003; d) R. Lenz, B. Giese, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2784.
- [21] a) A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648; b) C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B* **1988**, 37, 785.
- [22] T. H. Dunning, Jr., *J. Chem. Phys.* **1989**, 90, 1007.
- [23] A. E. Reed, L. A. Curtiss, F. Weinhold, *Chem. Rev.* **1988**, 88, 899.

- [24] S. D. Wetmore, D. M. Smith, J. T. Bennett, L. Radom, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14054.
- [25] a) A. G. Baboul, L. A. Curtiss, P. C. Redfern, K. Raghavachari, *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 7650; b) L. A. Curtiss, P. C. Redfern, K. Raghavachari, V. Rassolov, J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 4703.
- [26] a) V. Barone, M. Cossi, J. Tomasi, *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 3210; b) V. Barone, M. Cossi, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 1995; c) C. Amovilli, V. Barone, R. Cammi, E. Cancès, M. Cossi, B. Mennucci, C. S. Pomelli, J. Tomasi, *Adv. Quantum Chem.* **1998**, *32*, 227.
- [27] W. J. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. Madura, M. L. Klein, *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926.
- [28] T. P. Straatsma, J. A. McCammon, *J. Chem. Phys.* **1991**, *95*, 1175.
- [29] MOLPRO 2000: H.-J. Werner, P. J. Knowles; mit Beiträgen von R. D. Amos, A. Bernhardsson, A. Berning, P. Celani, D. L. Cooper, M. J. O. Deegan, A. J. Dobbyn, F. Eckert, C. Hampel, G. Hetzer, T. Korona, R. Lindh, A. W. Lloyd, S. J. McNicholas, F. R. Manby, W. Meyer, M. E. Mura, A. Nicklass, P. Palmieri, R. Pitzer, G. Rauhut, M. Schütz, H. Stoll, A. J. Stone, R. Tarroni, T. Thorsteinsson.
- [30] Gaussian 98 (Revision A.7), M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery, R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, A. G. Baboul, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. G. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, J. A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, **1998**.
- [31] D. A. Case, D. A. Pearlman, J. W. Caldwell, T. E. Cheatham III, W. S. Ross, C. L. Simmerling, T. A. Darden, K. M. Merz, R. V. Stanton, A. L. Cheng, J. J. Vincent, M. Crowley, V. Tsui, R. J. Radmer, J. Duan, J. Pitera, I. Massova, G. L. Seibel, U. C. Singh, P. K. Weiner, P. A. Kollman, AMBER6, University of California, San Francisco, **1999**.