

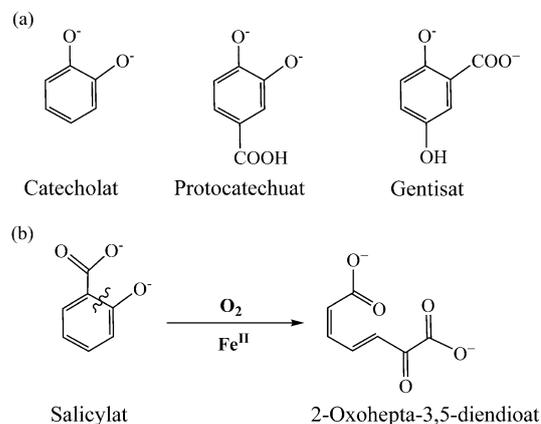
O₂-AktivierungDeutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201506363
Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201506363

QM/MM-Simulationen ergeben synergetische Substrat- und Sauerstoffaktivierung in Salicylat-Dioxygenase

Subhendu Roy und Johannes Kästner*

Abstract: Salicylat-1,2-Dioxygenase (SDO) ist das erste bekannte Enzym, das die oxidative Spaltung eines einfach hydroxylierten Aromaten, Salicylat, statt der wohlbekannteren elektronenreichen Substrate katalysiert. Wir haben den Mechanismus der Sauerstoffaktivierung in SDO mit QM/MM-Simulationen untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen, dass das Nicht-Häm-Fe^{II}-Zentrum in SDO Salicylat und O₂ gemeinsam durch eine starke kovalente Wechselwirkung aktiviert, um die reduktive Spaltung von O₂ zu ermöglichen. Die reaktive Sauerstoffspezies ist ein kovalenter Salicylat-Fe^{II}-O₂-Komplex, wobei die Elektronenstruktur zwischen den beiden Grenzfällen Fe^{II}-O₂ und Fe^{II}-O₂⁻ mit partiellem Elektronentransfer vom aktivierten Salicylat zu O₂ über das Fe-Zentrum liegt. Folglich verwendet SDO eine synergetische Strategie der Substrat- und Sauerstoffaktivierung, um die katalytische Reaktion auszuführen, die einmalig in der Familie der Eisendioxigenasen ist. Darüber hinaus erfolgt die O₂-Aktivierung in SDO ohne die Hilfe einer Protonenquelle. Unsere Studie zeigt eine bisher unbekanntere Möglichkeit für den Mechanismus der O₂-Aktivierung.

Einkernige Nicht-Häm-Eisenenzyme erschließen das große Oxidationsspotential von Sauerstoff, um eine große Bandbreite von biologischen Aufgaben durchzuführen.^[1–6] Von besonderer Wichtigkeit sind diejenigen Eisen-Dioxygenasen, die die chemisch höchst interessante Reaktion von Triplett-O₂ mit organischen Singulett-Substraten katalysieren. Das Reduktionspotential von Fe^{II}/Fe^{III} reicht für die Aktivierung von O₂ in einer Einelektronenreduktion nicht aus.^[7] Im Allgemeinen aktivieren die meisten Nicht-Häm-Oxygenasen, wie die Extradioldioxygenasen, O₂ durch eine Fe^{II}/Fe^{III}-Redoxreaktion mit high-spin-Fe^{II} in der Gegenwart des Substrats oder eines zusätzlichen Kofaktors als Elektronenquelle. Die andere wichtige Enzymklasse, die Intradioldioxygenasen, nutzen Fe^{III}, wobei O₂ das Substrat direkt angreift. Allgemein nutzen die Extradiolenzyme (Fe^{II}) den Sauerstoffaktivierungspfad, wohingegen die Intradiolenzyme (Fe^{III}) einen Substrataktivierungsmechanismus verwenden.^[7,8] In allen Fällen (Intradiol und Extradiol) sind die Substrate elektronenreich, z. B. substituierte Catechole, Protocatechuate und Gentsitate (Schema 1a), und erleichtern dadurch die für die reduktive Spaltung von O₂ benötigte Elektronenabgabe.



Schema 1. a) Bekannte Substrate von Dioxygenasen. b) Reaktion, die durch Salicylat-1,2-Dioxygenase (SDO) katalysiert wird.

Demnach sind die Substrate in diesen Dioxygenasen entweder Dihydroxyverbindungen oder enthalten mindestens eine elektronenabgebende Gruppe im aromatischen Ring.^[9] Verschiedene Spezies wie Fe^{III}-O₂⁻^[10] oder der Hybridzustand Fe^{III}-O₂⁻/SQ⁻-Fe^{II}-O₂⁻ (SQ = Semichinon)^[11] wurden auf Basis von DFT- bzw. QM/MM-Rechnungen als reaktive Sauerstoffspezies in Homoprotocatechuat-2,3-Dioxygenase (HPCD) vorgeschlagen. Kürzlich wurde Salicylat-1,2-Dioxygenase (SDO) aus *Pseudaminobacter salicylatoxidans* isoliert, welches die oxidative Spaltung von Salicylat zu 2-Oxohepta-3,5-dienoat über einen neuartigen Ringspaltungsmechanismus katalysiert (Schema 1b).^[12] SDO spielt eine maßgebliche Rolle im biologischen Abbau von Aromaten, die sich aufgrund industriell und landwirtschaftlich bedingter Verunreinigungen in der Umwelt anhäufen.

Vor allem ist SDO das erste Enzym, für das die Spaltung eines einfach hydroxylierten Aromaten, Salicylat, statt der bereits bekannten elektronenreichen Substrate nachgewiesen werden konnte. Selbst Salicylat-1-Monooxygenase benötigt für seine katalytische Aktivität den zusätzlichen Kofaktor FAD.^[13] Das Besondere an SDO ist, dass es ein Substrat, das keine Dihydroxyverbindung ist und keine Elektronendonorguppe besitzt, aufspalten kann und dies auch ohne zusätzlichen Kofaktor bewerkstelligt. Es stellt die allgemein anerkannte These in Frage, dass das Substrat die für die Spaltung von O₂ benötigten Elektronen liefern muss, da das Reduktionspotential von Fe^{II}/Fe^{III} für diesen Vorgang nicht ausreicht. Es muss daher untersucht werden, wie die O₂-Aktivierung für solch ein einfach hydroxyliertes Substrat in SDO funktioniert. Ein weiterer hochinteressanter Aspekt ist die bisher ungeklärte Rolle der Aminosäuren Histidin 162 und Arginin 127,

[*] Dr. S. Roy, Prof. Dr. J. Kästner
Institut für Theoretische Chemie, Universität Stuttgart
Pfaffenwaldring 55, 70569 Stuttgart (Deutschland)
E-Mail: kaestner@theochem.uni-stuttgart.de

Hintergrundinformationen und ORCID-IDs der Autoren zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201506363> zu finden.

von denen angenommen wurde, dass ihnen eine aktive Säure-Base-Rolle in SDO zukommt.^[12a]

Solch eine Aminosäure soll die O₂-Aktivierung unterstützen, indem sie die Bildung eines Superoxydliganden erleichtert und/oder diesen protoniert, um ein Hydroperoxid zu bilden.^[5] Wie unterstützen diese Aminosäuren die Aktivierung in SDO? Oder geschieht die O₂-Aktivierung ohne eine Protonenquelle? Um diese grundlegenden Fragen zu beantworten, müssen die chemischen Reaktionen in einer realistischen Umgebung simuliert werden. Die Kombination von Quantenmechanik und Molekularmechanik (QM/MM)^[14] ist eine vielversprechende Methode, um eine solche enzymatische Reaktion in einer realistischen Umgebung zu simulieren.^[15]

Um diese Fragen zu beantworten, untersuchen wir den Mechanismus der O₂-Aktivierung in SDO mittels QM/MM-Simulationen. Unseres Wissens ist dies die erste QM/MM-Untersuchung einer Dioxygenase der Klasse III (SDO), im Gegensatz zu Klasse I (Intradiol-) und Klasse II (Extradioldioxygenasen), für die bereits umfangreiche Literatur existiert. Wir geben erstmalig einen neuartigen Mechanismus zur molekularen O₂-Aktivierung in der Familie der Eisendioxygenasen an.

Salicylat-1,2-Dioxygenase (SDO) wurde der PDB-Struktur 3NJZ^[12b] entnommen, welche die Struktur von SDO aus *Pseudaminobacter salicylatoxidans* inklusive Salicylatsubstrat in einer Auflösung von 2.1 Å enthält. O₂ wurde dem Eisenzentrum des Monomermodells hinzugefügt, um ein Fe-O₂-Addukt im Katalysezyklus von SDO zu erhalten. Die QM/MM-Rechnungen werden mit der Chemshell-Suite^[16] durchgeführt. Das Kraftfeld CHARMM22^[17] wurde für den MM-Teil der Simulation benutzt. Die QM-Rechnungen wurden mit TURBOMOLE in der Version 6.4^[18] durchgeführt. Der QM-Teil wurde, wenn nicht anders angegeben, aus Fe, Salicylat, O₂, den Seitenketten der Aminosäuren der ersten Koordinationssphäre (His119, His121, His160) sowie von Arginin 127 gebildet (Abbildung 1). Der QM-Teil wird durch das B3LYP-Hybridfunktional^[19] in Kombination mit dem Basissatz def2-SVP^[20] beschrieben, eine Kombination, für die

gezeigt wurde, dass sie für Dioxygenasen verlässliche Ergebnisse liefert.^[8,10a,11] An den damit erhaltenen Strukturen wurde die Energie mit dem größeren Basissatz def2-TZVP^[21] berechnet. Der QM-Teil besitzt bei den Geometrieoptimierungen eine Gesamtladung von +1 bei einer Spindichte von 5. Die natürliche Spindichte^[22] wurde für die Komplexe mit TURBOMOLE berechnet. Darüber hinaus wurden die Bindungsverhältnisse der QM-Region der QM/MM-optimierten Geometrie durch natürliche Bindungsorbitalanalyse (NBO), wie in Gaussian09^[23] implementiert, analysiert.

Wir beginnen mit der detaillierten Analyse der Elektronenstruktur des Enzym-Substrat-O₂-Komplexes (ESO₂; **1**), um die reaktive Sauerstoffspezies in SDO zu ermitteln. Die Kopplung von Quintett-Fe^{II} mit Triplett-O₂ kann zu Septett-, Quintett- und Triplett-Spinzuständen führen. Der Triplettzustand liegt energetisch um 3.4 kcal mol⁻¹ höher als der Quintettzustand. Die Berechnungen für den Septettzustand ergaben jedoch, dass dieser energetisch 2.7 kcal mol⁻¹ tiefer liegt als der Quintettzustand. Die Reaktionsbarriere für den ersten Schritt liegt für den Septettspinzustand mindestens 11.5 kcal mol⁻¹ über der für den entsprechenden Schritt auf der Quintett-Oberfläche.^[10a] Daher haben wir den Quintettzustand von **1** als den katalytisch relevanten Zustand der Reaktionen der einkernigen Nicht-Häm-Eisenenzyme genutzt.^[10a,11] Der optimierte ESO₂-Komplex **1** nimmt eine verzerrt oktaedrische Struktur ein, wobei O₂ endständig an das Fe bindet (Abbildung 1). Der Salicylatring ist in Richtung des O₂-Atoms von O₂ gekippt, um den O₂-Angriff zu ermöglichen. Mehrere Versuche, einen seitlich gebundenen O₂-Komplex zu erhalten (η^2), scheiterten. Diese resultierten immer in einer endständigen Koordination. Die Länge der Fe-O₁(O₂)-Bindung beträgt 1.98 Å in **1** (Abbildung 1), die etwas kürzer ist als die Fe-O(O)-Bindungslängen (2.10–2.22 Å)^[10a,11] in HPCD. Die O-O-Bindung des O₂ ist mit 1.26 Å länger als die eines freien O₂-Moleküls (1.20 Å). Die Fe-O(C1)- und Fe-O(C2)-Bindungslängen mit dem Salicylat betragen 2.05 Å bzw. 1.92 Å, was relativ kurz ist im Vergleich zu den Fe-O_{Substrat}-Bindungen bei HPCD.^[11] Die vergleichsweise kurzen Fe-O_{Substrat}-Bindungen deuten auf eine starke Metall-Salicylat-Bindung in **1** hin. Die wichtigsten einfach besetzten Grenzorbitale von **1** sind in Abbildung 2 dargestellt. Das höchste besetzte Molekülorbital (HOMO, β) und das dritthöchste (HOMO–2, β) zeigen eine starke Wechselwirkung zwischen dem Metall, O₂ und dem Salicylat. Die fünf unbesetzten β -Orbitale besitzen größere Metall-d-Orbital-Beiträge (Abbildung S2, Hintergrundinformationen (SI)). Die besetzten α -Fe-d-Orbitale sind sehr gut stabilisiert. Dies zeigt, dass die kovalente Wechselwirkung nicht gleichmäßig auf die drei Einheiten verteilt ist. Folglich sehen wir, dass die Metall-d-Orbitale nur geringfügig zur Bildung der Grenzorbitale beitragen.

In **1** betragen die natürlichen Spindichten bei Fe, O₂ und Sal (Sal = Salicylat) 3.80, –0.27 und 0.29 (Tabelle S1, SI), was eine anti-ferromagnetische Kopplung zwischen den Fe- und O₂-Zentren mit einem Teil der Spindichte auf dem weiter entfernten O₂-Atom impliziert. Die Spindichte auf dem Substrat ist größtenteils auf den O-Donoratomen lokalisiert. Die verhältnismäßig geringe Spindichte auf dem Fe-Zentrum wird der starken kovalenten Wechselwirkung mit dem Sa-

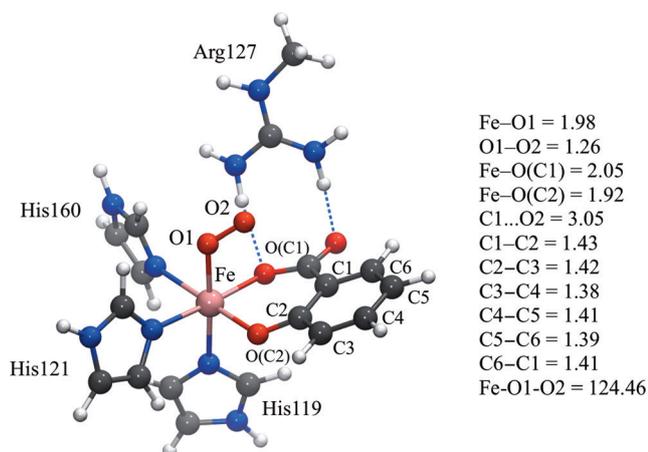


Abbildung 1. Optimierte Struktur des ESO₂-Komplexes **1** mit B3LYP/def2-SVP/MM. Abstände in Å und Winkel in Grad (C grau, H weiß, N blau, O rot).

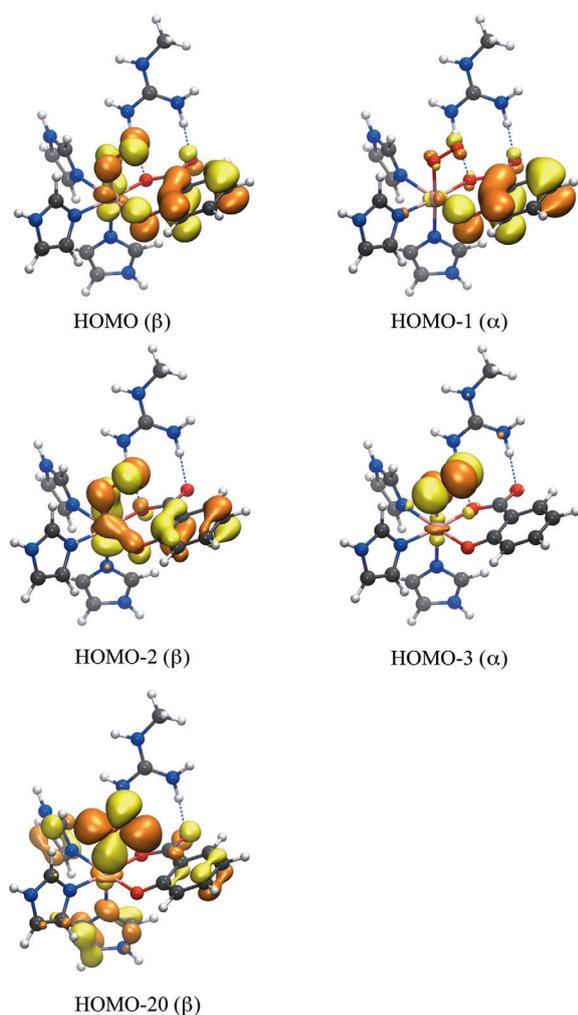
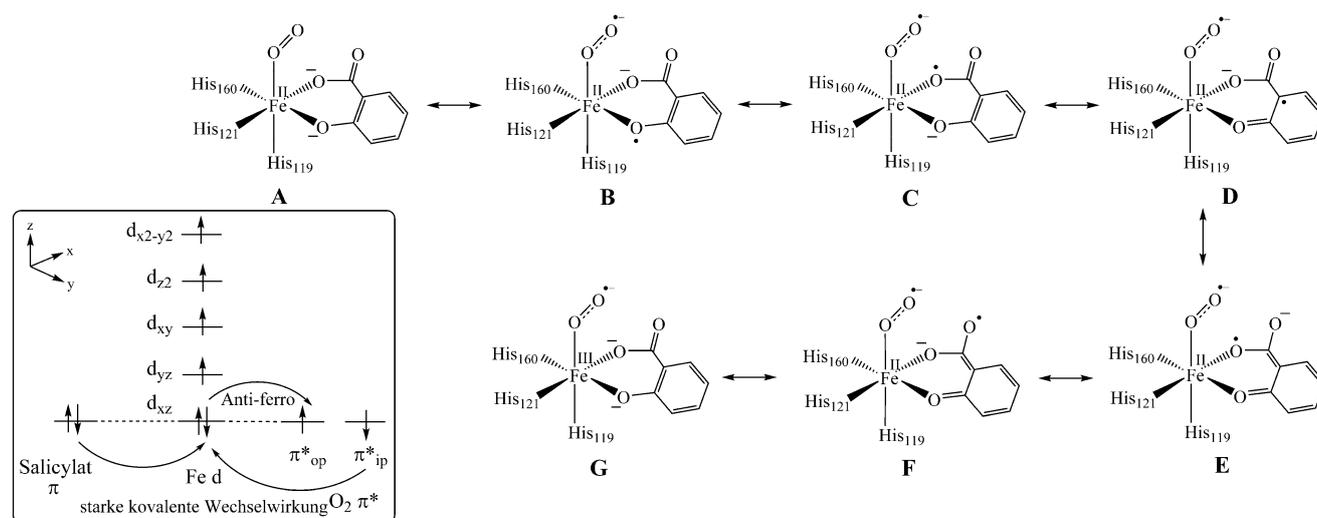


Abbildung 2. Wichtige einfach besetzte Molekülorbitale (MO) des ESO_2 -Komplexes **1**.

licylat und O_2 zugeschrieben, die das Metallzentrum reduzieren. Salicylat behält in **1** seine planare Struktur bei, was

gegen jegliche Störung der planaren Aromatizität durch radikalischen Charakter (Elektronentransfer zu O_2) spricht. Dies ist konsistent zur Analyse der Spindichte. Wie wird O_2 nun aktiviert? Die Antwort liegt, wie es aus den Molekülorbitalen (Abbildung 2) deutlich wird, in der stark kovalenten Natur von **1**. Fe^{II} aktiviert das Salicylat durch eine starke kovalente Wechselwirkung, um partiell β -Elektronendichte auf O_2 - π^* -Orbitale über das Fe^{II} -Zentrum zu übertragen. Die zusätzliche Elektronendichte bei O_2 liegt in den π^* -Orbitalen senkrecht zur Fe-O-O-Ebene. Die C-C- π -Bindungen in Salicylat sind durch eine starke kovalente Wechselwirkung mit dem Fe-Zentrum gestört, wie es bereits für das HOMO (β) und HOMO-2 (β) beobachtet wurde. Die im Verhältnis zu den anderen C-C-Bindungen recht lange C1-C2-Bindung (1.43 Å) im Ring ist in diesem Zusammenhang ebenfalls erwähnenswert (Abbildung 1). Dies impliziert, dass das Salicylat und O_2 synergetisch für die Reaktion durch das Fe^{II} -Zentrum aktiviert werden. Sogar der relativ enge Kontakt zwischen den O2- und C1-Atomen (3.05 Å) in **1** deutet auf den Beginn des Elektronentransferprozesses von der aktivierten C1-C2- π -Bindung zum O_2 hin, was durch das HOMO-1 (α) und HOMO-20 (β) bekräftigt wird.

Die sieben möglichen Resonanzstrukturen für **1** sind in Schema 2 dargestellt. Neben der σ -Bindung zwischen Fe und Salicylat zeigt die NBO-Analyse auch, dass das β -Elektron an O(C2) des Salicylats an einer starken π -kovalenten Donorwechselwirkung mit dem Fe-Zentrum in der Zusammensetzung $0.886 \text{ O}(\text{C}2)(\text{p}) + 0.114 \text{ Fe}(\text{d})$ mit 89,9% Besetzung beteiligt ist, die sich im Mehrfachbindungscharakter der Fe-O(C2)-Bindung widerspiegelt (Tabelle S2, Abbildung S4, S1). Dies resultiert in einer partiellen α -Spindichte an O(C2). Die Mitwirkung von π -Orbitalen des Salicylatrings bei den kovalenten Donor- π -Wechselwirkungen wird aus dem HOMO (β) und HOMO-2 (β) klar ersichtlich. Ähnlich starke kovalente Wechselwirkungen, um partielle β -Elektronendichte vom Substrat zu O_2 zu transferieren, werden bei den Intradioxygenasen beobachtet.^[24] Die starken kovalenten π -Donor-Wechselwirkungen spielen eine maßgebliche Rolle in der Bindung von **1**. Die C2-O(C2)-Bindung hat Einzelbin-



Schema 2. Mögliche Resonanzstrukturen für **1** und schematische Darstellung des Elektronentransferprozesses in **1**.

dungscharakter, was jegliche semichinonartige Struktur ausschließt. Die antiferromagnetische Kopplung zwischen den O_2 - und Fe-Zentren überträgt β -Elektronendichte vom $Fe-d_{xz}$ -Orbital auf das $O_2-\pi^*$ -Orbital, was einen partiellen Superoxidcharakter ergibt. Dieser Übertrag von β -Elektronendichte aus besetzten $O_2-\pi^*$ -Orbitalen auf unbesetzte $Fe-\beta$ -d-Orbitale zeigt die kovalente Wechselwirkung zwischen O_2 und Fe. Folglich erhält das Fe-Zentrum β -Elektronendichte vom Salicylat durch eine starke kovalente Wechselwirkung, um diese an O_2 für dessen Aktivierung weiterzugeben (Schema 2).^[24,25] Die Summe der NBO-Ladungen des Salicylats beträgt $-1.51e$, diejenige von O_2 beträgt $-0.44e$. Dies bedeutet, dass das Salicylat $0.44e$ abgibt und O_2 $0.44e$ erhält, was ein weiterer Punkt ist, der für einen partiellen Elektronentransfer vom aktivierten Salicylat zum O_2 über das Fe-Zentrum spricht. Daher sind, basierend auf den Analysen der Strukturparameter, MO, NBO und Spindichte, die Resonanzstrukturen **A** und **B** maßgeblich, um **1** zu beschreiben. Wir schlagen hier also vor, dass der kovalente Sal- Fe^{II} - O_2 -Komplex als reaktive Sauerstoffspezies in SDO anzusehen ist. Die Elektronenstruktur des $Fe-O_2$ -Addukts wird am besten beschrieben durch eine Struktur zwischen den beiden Grenzfällen $Fe^{II}-O_2$ und $Fe^{II}-O_2^-$ mit partiellem Elektronentransfer vom aktivierten Salicylat über das Fe-Zentrum, um O_2 für die Reaktion zu aktivieren. Die Interpretation eines unveränderten Fe^{II} -Oxidationszustands bei der reaktiven Spezies wird maßgeblich durch die Erkenntnis gestützt, dass die Aktivität der Dioxygenase nicht vom Redoxpotential der Metallatome abhängt.^[25,26]

Unsere Analyse zeigt, dass diejenigen Gruppen, die die Fähigkeit des Salicylats zur Elektronenabgabe erhöhen (wie die OH- und NH_2 -Gruppen), die Aktivierung von O_2 unterstützen und dadurch die katalytische Effizienz von SDO erhöhen sollten. Tatsächlich stimmt dies gut mit experimentellen Beobachtungen überein.^[12a] Ebenso interessant wäre die Untersuchung des Effekts von elektronenziehenden Gruppen wie F und NO_2 im Salicylatring auf die katalytische Aktivität von SDO.

SDO ist einzigartig, da die Substrataktivierung durch ein reduziertes Fe^{II} -Metallion statt einem oxidierten Fe^{III} -Ion in der Intradioldioxygenase ausgelöst wird. Wir untersuchten auch den Enzym-Substrat-Komplex ohne O_2 , welcher eine starke kovalente Wechselwirkung zwischen dem Metall und dem Salicylat aufweist, was auch aus den Fe-O(C1)- und Fe-O(C2)-Bindungslängen deutlich wird (2.08 \AA bzw. 1.92 \AA), wenn man sie mit den Bindungslängen von 2.05 \AA und 1.92 \AA für den Komplex mit O_2 vergleicht. Unsere Studie zeigt, dass SDO eine einzigartige synergetische Substrataktivierungs- und Sauerstoffaktivierungs-Strategie nutzt, um die oxidative Spaltung eines einfach hydroxylierten Aromaten wie Salicylat durchzuführen, die neuartig ist in der Familie der Eisen-Dioxygenasen. Tatsächlich zeigt der Übergangszustand **TS1** des ersten Schritts bei der Bildung des Alkylperoxo-Intermediats^[27,28] **2** (Abbildung 3) die vollständige Ausbildung der O2-C1-Bindung mit dem gleichzeitigen Transfer zweier Elektronen zu O_2 vom π -System des Salicylats (SI).

Die Position von His162 in **1** ist zu weit entfernt von O_2 (6.4 \AA), um als aktiver Säure-Base-Partner zu fungieren. Wir

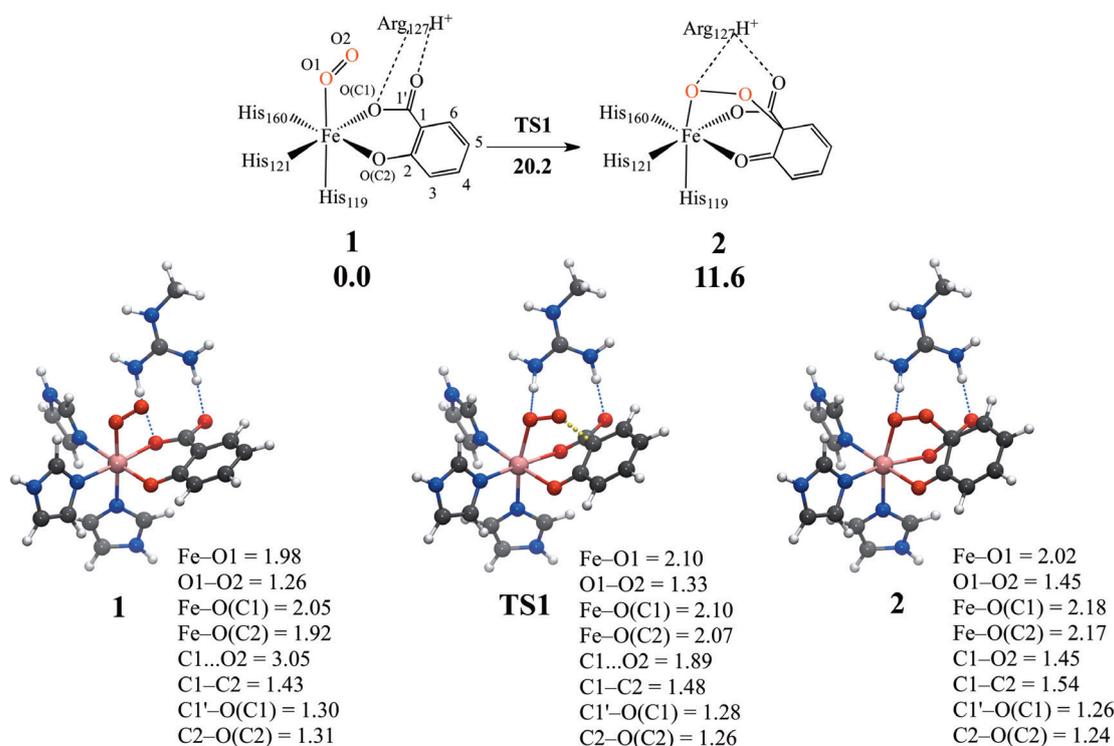


Abbildung 3. Optimierte Geometrien von **1**, **TS1** und **2** im Quintett-Zustand auf B3LYP/def2-SVP/MM-Niveau (Bindungslängen in \AA , Winkel in Grad, Energien in kcal mol^{-1}).

konnten auch nach mehreren Versuchen von MD-Simulation des solvatisierten Enzyms kein Wassermolekül ausfindig machen, das als Protonenquelle dienen könnte. Folglich gibt es keine Protonenquelle für die katalytische Aktivität von SDO. Dies ist im Vergleich zu den anderen einkernigen Nicht-Häm-Eisendioxxygenasen sehr ungewöhnlich.^[5] Stattdessen beobachteten wir, dass Arg127 die Carboxylat-O-Atome des Salicylats durch H-Brücken-Bildung in **1** stabilisiert. Es wurde gezeigt, dass Arginin die O₂-Aktivierung bei 3-Hydroxyanthranilat-3,4-Dioxygenase^[5] und bei AlkB-Reparaturenzymen unterstützt.^[29] Arg83 befindet sich gegenüber von O₂ in der Nähe des Substrats. Unsere Ergebnisse stimmen ausgezeichnet mit den experimentellen Beobachtungen überein, die basierend auf Mutationsstudien zeigen, dass Arg127 essenziell für die enzymatische Aktivität von SDO ist.^[30] Daher schlagen wir vor, Arg127 durch eine bekannte Protonenquelle wie His in SDO zu ersetzen, um den Effekt dieser Mutation auf die katalytische Effizienz, mit der SDO einfach hydroxylierte aromatische Substrate spaltet, zu untersuchen. Wir untersuchten den Effekt, den die Proteinumgebung auf den ESO₂-Komplex ausübt, durch einen Vergleich mit einem Gasphasen-Modell. Dieses beinhaltet die QM-Region der vollständigen QM/MM-Simulationen, wobei die Positionen der H-Atome der QM/MM-Schnittstelle festgehalten werden. Gasphasenoptimierung des Modells führt zu einer spontanen Rotation von O₂ um die Fe-O-Bindung, sodass O₂ in Richtung des His-Liganden zeigt (Abbildung S3, SI), was dem Fehlen der Proteinumgebung zugeschrieben werden kann.^[10a,11] Der Triplett-Charakter von O₂ (Tabelle S3, SI) nimmt in der optimierten Gasphasengeometrie mit der erhöhten Spindichte am Fe-Zentrum (4.03) zu. Dies zeigt den erheblichen Einfluss der Proteinumgebung auf die Elektronenstruktur von **1** sowie auf die richtige Orientierung des O₂ zum Substrat. Jedoch zeigen die Cluster-Modelle auch signifikante kovalente Metall-Salicylat-Wechselwirkungen, wie sie auch für die vollständigen QM/MM-Simulationen beobachtet werden. Zudem erleichtert das 3His-Ligand-Motiv die Reaktion, indem es die kovalente Wechselwirkung zwischen Fe und O₂ verstärkt (SI).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir auf Basis von QM/MM-Simulationen gezeigt haben, dass das Nicht-Häm-Fe^{II}-Zentrum das Salicylat und O₂ synergetisch durch eine starke kovalente Wechselwirkung in **1** aktiviert. Ein kovalenter Sal-Fe^{II}-O₂-Komplex ist die reaktive Sauerstoffspezies im Katalysezyklus von SDO, dessen Elektronenstruktur am besten als eine Struktur zwischen den beiden Grenzfällen Fe^{II}-O₂ und Fe^{II}-O₂⁻ mit partiellem Elektronentransfer vom aktivierten Salicylat zum O₂ über das Fe-Zentrum beschrieben wird. Dabei verwendet SDO eine einzigartige Strategie der synergetischen Substrat- und Sauerstoffaktivierung, um die reduktive Spaltung von O₂ durchzuführen, die einzigartig in der Familie der Eisen-Dioxygenasen ist. Darüber hinaus geschieht die O₂-Aktivierung in SDO ohne die Unterstützung durch eine Protonenquelle. Zudem beeinflusst die Proteinumgebung maßgeblich die Elektronenstruktur von **1**, um die Reaktion zu erleichtern. Es ist davon auszugehen, dass diese Erkenntnisse bei der Entwicklung biomimetischer Katalysatoren für die Nutzung von O₂ hilfreich sein könnten, besonders im Kontext der Substratauswahl.

Danksagung

Diese Studie wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) im Sonderforschungsbereich SFB716 und von der Baden-Württemberg Stiftung finanziell unterstützt.

Stichwörter: Dioxygenasen · Metallenzyme · Nicht-Häm-Eisen-Proteine · QM/MM · Sauerstoff

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1168–1172
Angew. Chem. **2016**, *128*, 1182–1187

- [1] E. G. Kovaleva, J. D. Lipscomb, *Nat. Chem. Tech.* **2008**, *4*, 186.
- [2] M. Costas, M. P. Mehn, M. P. Jensen, L. Que, Jr., *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 939.
- [3] D. Buongiorno, G. D. Straganz, *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257*, 541.
- [4] E. I. Solomon, T. C. Brunold, M. I. Davis, J. N. Kemsley, S. K. Lee, N. Lehnert, F. Neese, A. J. Skulan, Y. S. Yang, J. Zhou, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 235.
- [5] T. D. H. Bugg, S. Ramaswamy, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 134.
- [6] E. G. Kovaleva, M. B. Neibergall, S. Chakrabarty, J. D. Lipscomb, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 475.
- [7] M. Y. M. Pau, J. D. Lipscomb, E. I. Solomon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 18355.
- [8] T. Borowski, P. E. M. Siegbahn, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12941.
- [9] M. R. Harpel, J. D. Lipscomb, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 22187.
- [10] a) G. J. Christian, S. F. Ye, F. Neese, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 1600; b) H. Hirao, K. Morokuma, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17901; c) W. A. van der Donk, C. Krebs, J. M. Bollinger, Jr., *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 673.
- [11] G. Dong, S. Shaik, W. Z. Lai, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 3624.
- [12] a) I. Matera, M. Ferraroni, S. Bürger, A. Scozzafava, A. Stolz, F. Briganti, *J. Mol. Biol.* **2008**, *380*, 856; b) M. Ferraroni, I. Matera, L. Steimer, S. Bürger, A. Scozzafava, A. Stolz, F. Briganti, *J. Struct. Biol.* **2012**, *177*, 431; c) M. Ferraroni, I. Matera, S. Bürger, S. Reichert, L. Steimer, A. Scozzafava, A. Stolz, F. Briganti, *FEBS J.* **2013**, *280*, 1643.
- [13] S. Yamamoto, M. Katagiri, H. Maeno, O. Hayaishi, *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 3408.
- [14] a) A. Warshel, M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 5612; b) A. Warshel, M. Levitt, *J. Mol. Biol.* **1976**, *103*, 227.
- [15] a) H. Senn, W. Thiel, *Topics in Current Chemistry*, Vol. 268, Springer, Berlin, **2007**, S. 173; b) H. Senn, W. Thiel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 182; c) H. Lin, D. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.* **2007**, *117*, 185.
- [16] a) P. Sherwood et al. *J. Mol. Struct. (Theochem.)* **2003**, *632*, 1; b) S. Metz, J. Kästner, A. A. Sokol, T. W. Keal, P. Sherwood, *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2014**, *4*, 101.
- [17] a) A. D. MacKerell, Jr. et al., *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 3586; b) A. D. MacKerell, Jr., M. Feig, C. L. Brooks III, *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1400; c) N. Foloppe, A. D. MacKerell, Jr., *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 86; d) A. D. MacKerell, Jr., N. Banavali, *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 105.
- [18] *TURBOMOLE*, V6.4 2012, a development of University of Karlsruhe and Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, 1989–2007, TURBOMOLE GmbH, since 2007; available from www.turbomole.com.
- [19] a) A. D. Becke, *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098; b) C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785; c) A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648.
- [20] A. Schäfer, H. Horn, R. Ahlrichs, *J. Chem. Phys.* **1992**, *97*, 2571.
- [21] A. Schäfer, C. Huber, R. Ahlrichs, *J. Chem. Phys.* **1994**, *100*, 5829.

- [22] A. E. Reed, L. A. Curtiss, F. Weinhold, *Chem. Rev.* **1988**, 88, 899.
- [23] Gaussian09, Revision D.01, M. J. Frisch, et al., Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2013**. Siehe Hintergrundinformationen für die vollständige Referenz.
- [24] M. Y. M. Pau, M. I. Davis, A. M. Orville, J. D. Lipscomb, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 1944.
- [25] M. M. Mbughuni, M. Chakrabarti, J. A. Hayden, K. K. Meier, J. J. Dalluge, M. P. Hendrich, E. Münck, J. D. Lipscomb, *Biochemistry* **2011**, 50, 10262.
- [26] a) J. P. Emerson, E. G. Kovaleva, E. R. Farquhar, J. D. Lipscomb, L. Que, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 7347; b) M. M. Mbughuni, M. Chakrabarti, J. A. Hayden, E. L. Bominaar, M. P. Hendrich, E. Munck, J. D. Lipscomb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, 107, 16788.
- [27] E. G. Kovaleva, J. D. Lipscomb, *Science* **2007**, 316, 453.
- [28] J.-H. Jeoung, M. Bommera, T.-Y. Lina, H. Dobbeka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, 110, 12625.
- [29] M. G. Quesne, R. Latifi, L. E. Gonzalez-Ovalle, D. Kumar, S. P. de Visser, *Chem. Eur. J.* **2014**, 20, 435.
- [30] E. Eppinger, M. Ferraroni, S. Bürger, L. Steimer, G. Peng, F. Briganti, A. Stolz, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2015**, 1854, 1425.

Eingegangen am 10. Juli 2015,
veränderte Fassung am 18. September 2015
Online veröffentlicht am 24. November 2015