

Mechanism Study of the Reduction of O⁶-4-Nitrobenzyl-Guanine Catalysed by FMNH

Jiabin Xiao^{1,2*}, Guohui Sun^{1,2}

¹College of Life Science & Bioengineering, Beijing University of Technology, Beijing

²Beijing Key Laboratory of Environmental & Viral Oncology, Beijing

Email: *s201315079@emails.bjut.edu.cn

Received: Apr. 15th, 2016; accepted: May 2nd, 2016; published: May 5th, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

The reduction mechanism of O⁶-Alkylguanine DNA Alkyltransferase inhibitor of the nitro group of the pro-drug in the Nitro Reductase (NTR) was studied by using the Density Functional Theory (DFT). The results showed that the transitions of TS2 (yielding nitroso compound) and TS5 (yielding aniline compound) were the rate-limiting steps among the six reaction transition states. Single water molecule-mediated proton coupled electron transfer can lower the reactive activation energy of TS2 and TS6; thus it is speculated that water-mediated proton coupled electron transfer is the optimal reaction pathway of TS2 and TS6. The reduction mechanism of the prodrug of nitro aromatic compound and the involved reaction thermodynamics can be clearly presented by the potential energy curve. This study can provide a theoretical basis for designing more efficient hypoxia-activated AGT inhibitors with less side effects.

Keywords

AGT Inhibitor, Prodrug, Nitroreductase, Proton Coupled Electron Transfer

FMNH催化O⁶-4-硝基苄基鸟嘌呤还原机理的研究

肖家斌^{1,2*}, 孙国辉^{1,2}

*通讯作者。

¹北京工业大学生命科学与生物工程学院, 北京

²环境与病毒肿瘤学北京市重点实验室, 北京

Email: *s201315079@emails.bjut.edu.cn

收稿日期: 2016年4月15日; 录用日期: 2016年5月2日; 发布日期: 2016年5月5日

摘要

使用密度泛函理论(DFT)对O⁶-烷基鸟嘌呤-DNA-烷基转移酶(AGT)抑制剂的硝基类前体药物在硝基还原酶(NTR)作用下的还原机理进行了研究。结果显示, 在反应的六个过渡态中, 生成亚硝基反应的过渡态(TS2)和生成苯胺反应的过渡态(TS5)为反应的两个控速步骤。整个还原反应过程中水参与的质子电子耦合转移在过渡态TS2和TS6降低了反应的活化能, 推测水介导的质子电子耦合转移为这两步反应的优势途径。通过绘制反应势能曲线阐明了硝基芳烃类前体药物还原机理及其反应所涉及的热力学问题, 为制备高效低毒的AGT抑制剂的前体药物提供理论基础。

关键词

AGT抑制剂, 前体药物, 硝基还原酶, 质子电子耦合转移

1. 引言

氯乙基亚硝基脒(CENUs)是一类重要的抗癌烷化剂, 是目前临床上治疗恶性肿瘤的化疗药物之一。CENUs 通过导致 DNA 生成股间交联(dG-dC 交联), 阻断肿瘤细胞 DNA 的正常复制, 诱导肿瘤细胞凋亡而发挥抗癌作用[1]。然而, 由于细胞内的 O⁶-烷基鸟嘌呤-DNA 烷基转移酶(AGT)可对 CENUs 导致的烷化损伤进行修复[2], 抑制 dG-dC 交联的形成, 导致肿瘤细胞对药物产生耐药性。因此, 抑制肿瘤细胞内 AGT 的活性对提高药物化疗效果具有重要意义。目前, 已有一系列 AGT 抑制剂被合成用于与 CENUs 等烷化剂的联合化疗[3], 其中, O⁶-苄基鸟嘌呤(O⁶-BG)是第一个进入临床试验的 AGT 抑制剂, 具有良好的 AGT 抑制活性[4]。O⁶-BG 虽然为 CENUs 的肿瘤化疗开辟了新的领域, 但临床研究表明, O⁶-BG 由于不具有靶向性, 在提高肿瘤细胞对 CENUs 敏感性的同时, 也抑制了正常细胞内 AGT 的活性, 进而导致了 CENUs 的骨髓抑制作用显著增强, 降低了该类药物的化疗效应[5]。因此, 开发具有靶向性的 AGT 抑制剂对于提高烷化剂类化疗药物的抗癌效果具有重要意义。

肿瘤细胞的快速增殖导致高氧消耗, 肿瘤脉管系统的结构功能异常导致供氧不足, 使得瘤内低氧是实体瘤的重要特征之一。因此, 设计合成具有生物还原性的前体药物, 使其依赖于肿瘤低氧的微环境, 在低氧条件下激活为细胞毒素并靶向作用于肿瘤细胞, 已成为提高化疗药物疗效的新思路。研究表明, 生物还原性前体药物的激活主要通过单/双电子还原反应来实现。巴诺葱醌在低氧细胞内通过细胞色素 P450 催化的两步电子还原反应最终转变为具有细胞毒性的 DNA 结合剂, 可特异性地抑制 DNA 拓扑异构酶 II [6] [7]。替拉扎明在低氧条件下通过 P450 还原, 生成高活性的自由基, 诱导 DNA 单/双链断裂[8] [9]。TH-302 在低氧条件下可被激活生成 DNA 烷化剂溴代异磷酰胺, 从而靶向性地杀死肿瘤细胞[10] [11]。Sartorelli 课题组[12] [13]设计合成了一类低氧激活的 AGT 抑制剂前体药物——4-硝基苯甲氧基羰-2-氨基-O⁶-苄基鸟嘌呤基, 该类化合物本身对 AGT 无活性或活性很低, 但在低氧区域即可被此区域中的还原酶激活, 释放具有活性的 AGT 抑制剂。然而, 有关低氧激活 AGT 抑制剂的作用机制尚未见文献报道。因此, 本研究采用 DFT 方法对硝基苄基鸟嘌呤类化合物(NBGs)低氧激活的反应机理进行了研究, 阐明了在

低氧条件下NBGs经过硝基还原酶(NTR) [14]和辅酶FMNH [15] [16]介导的单电子传递过程和还原反应机理, 为低氧激活靶向性抗肿瘤药物的开发提供了可靠的理论依据。

2. 模型及计算方法

首先, 以硝基苯为模型, 研究了其在低氧条件下由 FMNH 催化的还原反应(如图 1 所示)进行了研究。在此基础上, 对图 2 所示的 O^6 -4-硝基苄基鸟嘌呤(O^6 -4-NBG)在 FMNH 作用下分别被还原为具有 AGT 抑制活性的 O^6 -4-氨基苄基鸟嘌呤(O^6 -4-ABG)的作用机理进行了研究。计算采用 DFT 方法在 UB3LYP/6-31+G(d,p)水平上进行, 对所有反应物、过渡态、中间体和产物进行全几何结构优化。在相同水平上对优化得到的各驻点几何结构进行振动频率计算, 确认所有稳定点无虚频; 所有过渡态只含有一个虚频, 并且频率的振动模式为沿着反应坐标方向的伸缩振动。计算内禀反应坐标以确认所有过渡态结构的合理性, 并获得反应的最低能量途径。所有计算均采用 Gaussian09 程序包进行。

3. 结果与讨论

3.1. 硝基苯还原机制

如图 1 所示, 硝基苯在 FMNH 的作用下被还原为苯胺的反应总共需要六个电子和六个质子的过程, 它可以分解为三个步骤, 这意味着存在两个中间体。在第一步还原反应中, 硝基基团通过 $2e^-/2H^+$ 的转移还原成中间体 I(亚硝基), 同时消去一分子水。在第二步还原反应中, 亚硝基通过 $2e^-/2H^+$ 的转移过程转化为中间体 II(羟胺)。最后, 羟胺通过 $2e^-/2H^+$ 的转移过程转化为苯胺, 同时消去一分子水[17] [18]。为了节约计算成本, 对计算模型进行了简化, 将 FMNH 分子中的异咯嗪环上的磷酸尾链用甲基代替(即简化为

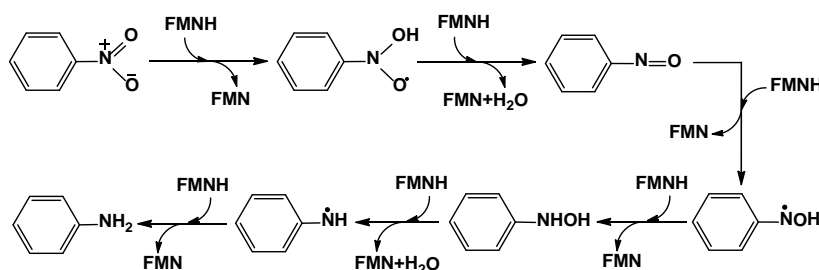


Figure 1. The pathways for FMNH reduction of nitrobenzene
图 1. FMNH 催化硝基苯还原的反应机理

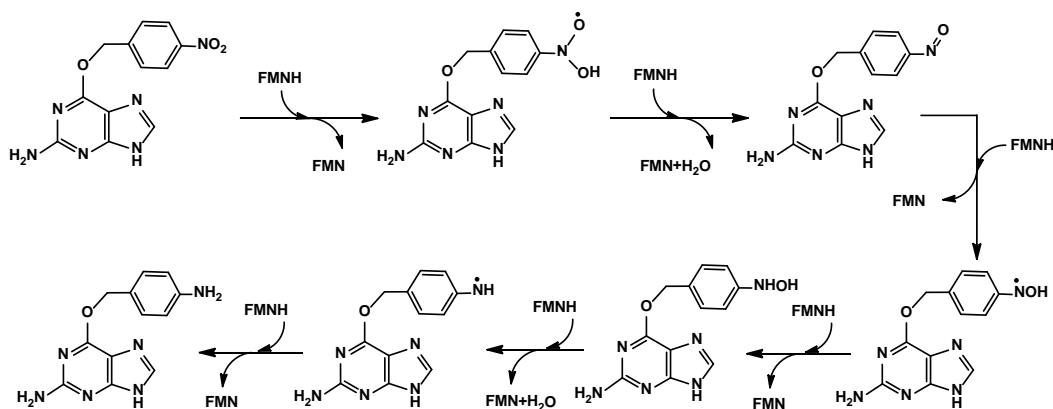


Figure 2. The pathways for FMNH reduction of O^6 -4-NBG
图 2. FMNH 还原 O^6 -4-硝基苄基鸟嘌呤的反应路径

FMNH-CH₃), 并将使用未简化和简化后的模型计算得到能量进行了比较, 以确认简化模型的合理性。以 FMNH-CH₃ 为模型采用 GaussView 5.0 计算得到的各步骤的过渡态结构如图 3 所示。在六个反应过渡态中 FMNH 的 N5 位上的 N-H 键与初始键长(1.01 Å)相对增长, 表明 FMNH 的 N5 位上的氢有断键趋势。其余各键中氧氢键的距离减小, 氮氧键增长及新的氮氢键的形成, 且各反应过渡态都存在唯一虚频。

在 B3LYP/6-31+G(d,p)水平上以 RC(0.00)为势能曲线基准采用吉布斯自由能绘制的势能曲线如图 4 所示。在整个反应过程中, 只有第一步羟基化反应生成 IC1 的步骤为吸热反应, 其它五个步骤均为放热反应。其中 TS2 反应所需跨越的能垒最高(30.11 kcal/mol), 因此经第二步脱水反应生成亚硝基苯的反应为控速步骤, 并且反应放热达 31.56 kcal/mol。TS3 反应所需过渡态能量最低, 亚硝基比硝基基团更容易发生反应, 因此亚硝基苯的含量很少。TS5 反应所需过渡态能量次于 TS2, TS5 可能是羟胺还原这一步反应的控速步骤, 由于 TS5 反应较慢, 因此羟胺被大量聚集, 而 TS6 反应所需能量较低且前一步反应提供大量的热量, 反应生成苯胺的速率较快。因此整个反应主要以羟胺和苯胺形式存在, 这与实验结果相一致[18]。可以看出简化模型并没有改变反应势能曲线的趋势, 总体能量低于未简化下的 1~3 kcal/mol, 因此使用简化模型对整个反应的势能曲线能量变化趋势和过渡态搜索没有太大的影响。

此外, 考虑了溶剂效应对反应的影响, 研究了水分子参与反应的过程, 其势能曲线如图 4 所示。水参与的质子电子耦合转移[19] [20]结果表明, 在水作为质子传递通道的条件下, TS2 (23.11 kcal/mol)和 TS6 (13.84 kcal/mol)反应活化能被降低, 比 FMNH-CH₃ 反应模型下的能量分别降低了 6.4 kcal/mol 和 2.03 kcal/mol, 因此这两步水分子参与反应降低了反应的活化能为该步反应的优势途径。采用 GaussView 5.0 计算得到水参与质子转移的过渡态结构和结构参数及过渡态下的 HOMO 轨道如图 5 所示。结果表明, 在 TS2-H₂O 中, 质子从 FMNH 的 N5 位转移到水的一个氧原子上(N⁺⋯H⁺⋯O), 然后通过水转移质子到羟基化的氧上(O⁺⋯H⁺⋯O), 并脱去两个水分子为质子转移通道。在 TS2-HOMO 中, FMNH 的 N5 的离域与硝基苯的 N 的离域两原子轨道重叠(N5⁺⋯N), 因此在 FMNH 的 N5 位和硝基苯的 N 之间作为电子传递途径[21]。在 TS6-H₂O 中, 质子从 FMNH 的 N5 位转移到水的一个氧原子上(N⁺⋯H⁺⋯O), 然后通过水转移质子到 IC₅ 的 N 原子上(O⁺⋯H⁺⋯N), 并脱去一个水分子为质子转移通道。在 TS6-HOMO 中, FMNH 的 N5 的离域与中间体 IC₅ 的 N 的离域两原子轨道重叠(N5⁺⋯N), 因此在 FMNH 的 N5 位和 IC₅ 的 N 之间作为电子传递途

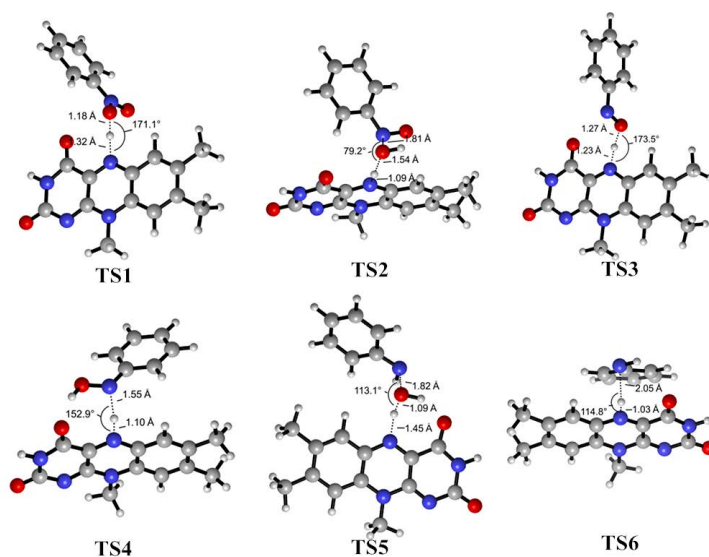


Figure 3. Optimized structures of the transition states in the reduction of nitrobenzene catalysed by FMNH calculated at the B3LYP/6-31+G(d,p) theoretical level

图 3. 在 B3LYP/6-31+G(d,p)水平上优化得到 FMNH 催化硝基苯还原反应的过渡态结构

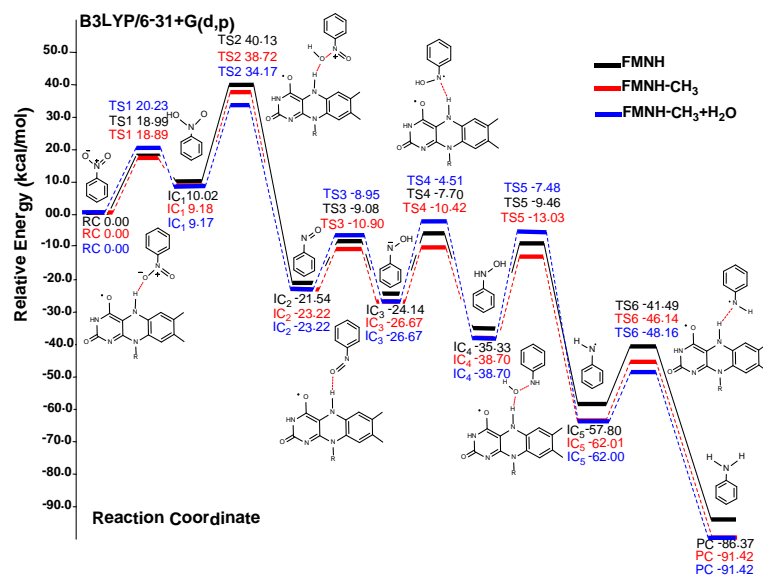


Figure 4. Energy profile for the reduction of nitrobenzene catalysed by FMNH calculated at the B3LYP/6-31+G(d,p) theoretical level

图 4. B3LYP/6-31+G(d,p)水平上计算得到的 FMNH 催化硝基苯还原反应的势能曲线

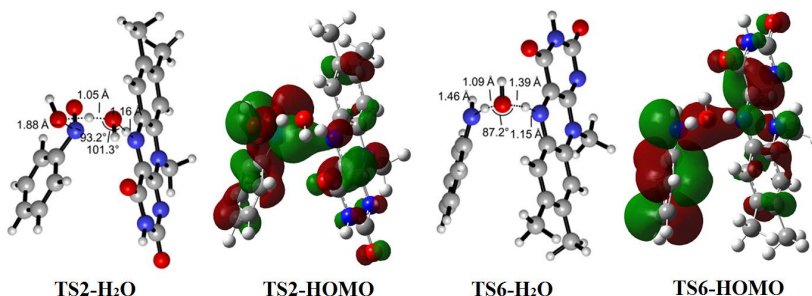


Figure 5. Geometric structures and HOMO of the transition states in the TS2 and TS6 of nitrobenzene mediated by a water molecule

图 5. 水分子参与下硝基苯的过渡态 TS2 和 TS6 的几何结构及 HOMO 示意图

径, 形成质子电子耦合转移。Wilkie 等人的研究表明[22], 在生成亚硝基的两步过渡态反应中至少有一步质子是来源于 FMNH, 而另一个质子来源于溶剂(水), 这与本实验中反应过渡态 TS1 得质子是由 FMNH 提供, TS2 是由溶剂水提供结果相一致。

3.2. O⁶-4-硝基苄基鸟嘌呤前体药物的还原机制

对图 2 所示反应途径中的各驻点在 B3LYP/6-31+G(d,p)水平上进行全几何结构优化和过渡态的搜索, 同时得出 TS2 和 TS6 在水参与下的质子耦合电子转移的最优反应路径, 其 GaussView 5.0 计算得到各反应的过渡态结构及结构参数如图 6; 计算结果表明, O⁶-4-硝基苄基鸟嘌呤(O⁶-4-NBG)在 FMNH 的条件下被还原成 O⁶-4-氨基苄基鸟嘌呤(O⁶-4-ABG)的反应分六个步骤。在各反应中 FMNH 的 N5 位上的 N-H 键与初始键长(1.01 Å)相对增长, 其余各键中氧氢键的距离减小, 氮氧键增长及新的氮氢键的形成, 且各反应过渡态都存在唯一虚频。

在 B3LYP/6-31+G(d,p)水平上以 RC(0.00)为势能曲线基准的采用吉布斯自由能绘制的势能曲线如图 7。其在采用 B3LYP 方法计算所得的结构下各过渡态反应能垒依次为: 18.97、30.14、9.45、15.68、24.81、16.91 kcal/mol。O⁶-4-NBG 的反应趋势和反应的活化能与硝基苯势能曲线一致, 可以看出硝基类化合物的

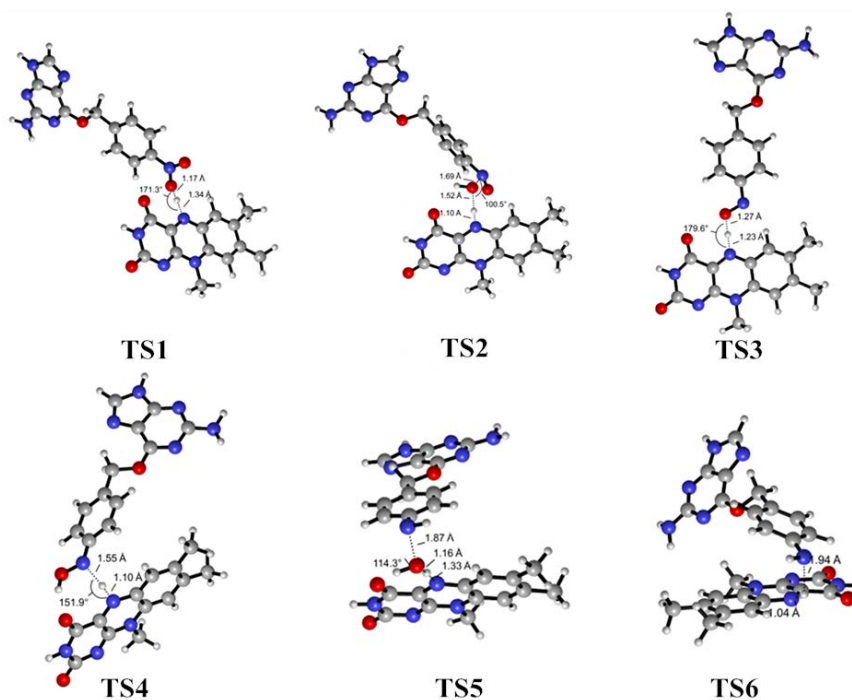


Figure 6. Optimized structures of the transition states in the reduction of O⁶-4-NBG catalysed by FMNH calculated at the B3LYP/6-31+G(d,p) theoretical level

图 6. 在 B3LYP/6-31+G(d,p) 水平上优化得到 FMNH 催化 O⁶-4-NBG 还原反应的过渡态结构

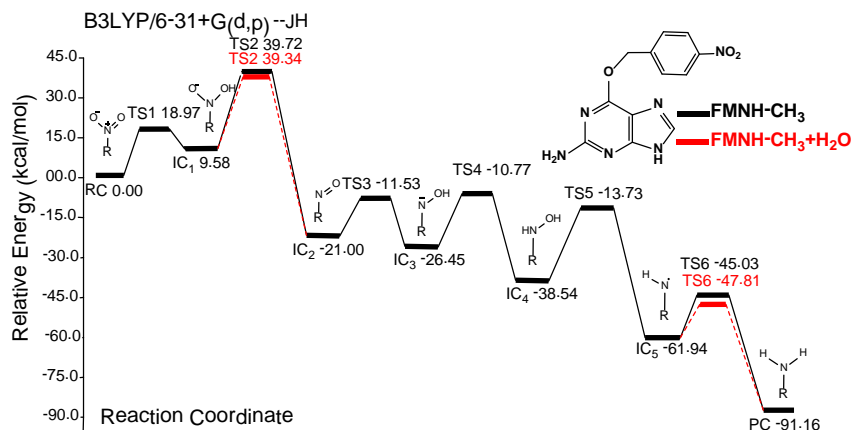


Figure 7. Energy profile for the reduction of O⁶-4-NBG catalysed by FMNH calculated at the B3LYP/6-31+G(d,p) theoretical level

图 7. B3LYP/6-31+G(d,p) 水平上计算得到的 FMNH 催化 O⁶-4-NBG 还原反应的势能曲线

反应机理与硝基所连的基团并没有太大影响。整个反应存在两个控速步骤分别生成亚硝基的过渡态 TS2 和生成氨基的过渡态 TS5，整个反应主要以羟胺化合物、苯胺化合物的形式存在，亚硝基化合物被瞬间反应含量很少。其中水分子参与过渡态反应优化了反应能垒的 TS2 和 TS6 反应所需能量为 29.75 kcal/mol 和 14.13 kcal/mol，分别降低了 0.39 kcal/mol 和 2.78 kcal/mol，因此这两步水分子参与反应降低了反应的活化能为该步反应的优势途径。采用 GaussView 5.0 计算得到水参与质子转移的过渡态结构和结构参数及过渡态下的 HOMO 轨道示意图如图 8 所示。其结果表明，在 TS2-H₂O 中，质子从 FMNH 的 N5 位转移

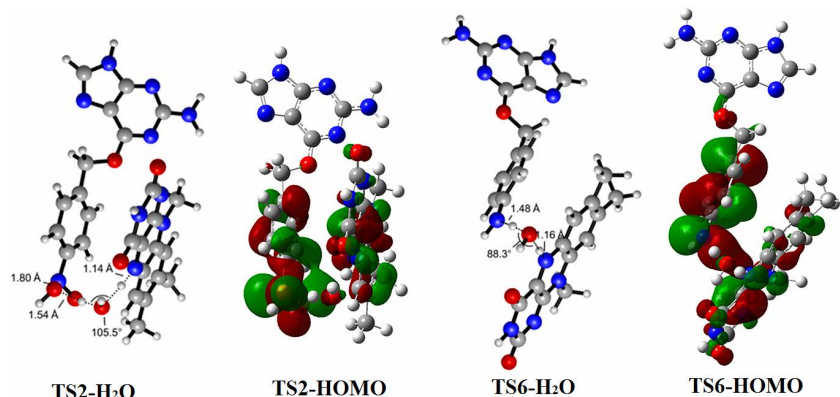


Figure 8. Geometric structures and HOMO of the transition states in the TS2 and TS6 of O⁶-4-NBG mediated by a water molecule

图 8. 水分子参与下 O⁶-4-NBG 的过渡态 TS2 和 TS6 的几何结构及 HOMO 示意图

到水的一个氧原子上(N[⋯]H[⋯]O), 然后通过水转移质子到羟基化的氧上(O[⋯]H[⋯]O), 并脱去两个水分子为质子转移通道。在 TS2-HOMO 中, FMNH 的 N5 的离域与硝基苯的 N 的离域两原子轨道重叠(N5[⋯]N), 因此在 FMNH 的 N5 位和硝基苯的 N 之间作为电子传递途径。在 TS6-H₂O 中, 质子从 FMNH 的 N5 位转移到水的一个氧原子上(N[⋯]H[⋯]O), 然后通过水转移质子到 IC₅ 的 N 原子上(O[⋯]H[⋯]N), 并脱去一个水分子为质子转移通道。在 TS6-HOMO 中, FMNH 的 N5 的离域与中间体 IC₅ 的 N 的离域两原子轨道重叠(N5[⋯]N), 因此在 FMNH 的 N5 位和 IC₅ 的 N 之间作为电子传递途径, 形成质子电子耦合转移。过渡态 TS2 和 TS6 降低了过渡态反应的活化能分别为这两步反应的优势路径。

4. 结论

综上所述, 在 B3LYP/6-31+G(d,p)水平上进行全几何结构优化和过渡态的搜索的计算结果表明, 硝基类化合物能够在低氧条件下被 FMNH 催化还原生成氨基类化合物。在整个还原反应中过渡态 TS2 和过渡态 TS5 分别为生成亚硝基和生成苯胺的两个反应的控速步骤。由于水分子在生物体内大量存在, 考虑水分子对整个反应的影响, 得出由水介导的过渡态 TS2 和 TS6 为这两步催化还原反应的优势途径。综上所述, 通过密度泛函的方法, 阐明了在低氧条件下 NBGs 经过硝基还原酶和辅酶 FMNH 介导的单电子传递过程和还原反应机理, 为低氧激活靶向性抗肿瘤药物的开发提供了可靠的理论依据。

参考文献 (References)

- [1] Zhao, L.J., Ma, X.Y. and Zhong, R.G. (2012) Comparative Theoretical Investigation of the Formation of DNA Interstrand Crosslinks Induced by Two Kinds of N-Nitroso Compounds: Nitrosoureas and Nitrosamines. *Journal of Physical Organic Chemistry*, **25**, 1153-1167. <http://dx.doi.org/10.1002/poc.2970>
- [2] Georgieva, P. and Himo, F. (2008) Density Functional Theory Study of the Reaction Mechanism of the DNA Repairing Enzyme Alkylguanine Alkyltransferase. *Chemical Physics Letters*, **463**, 214-218. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2008.08.043>
- [3] 马昕燕. 氯乙基亚硝基脲导致 DNA 股间交联及其修复机制的理论研究[D]: [硕士学位论文]. 北京: 北京工业大学生命科学与生物工程学院, 2013.
- [4] Apisarnthanarax, N., Wood, G.S., Stevens, S.R., *et al.* (2012) Phase I Clinical Trial of O⁶-Benzylguanine and Topical Carmustine in the Treatment of Cutaneous T-Cell Lymphoma, Mycosis Fungoides Type. *Archives of Dermatology*, **148**, 613-620. <http://dx.doi.org/10.1001/archdermatol.2011.2797>
- [5] Wilson, K.A. and Wetmore, S.D. (2014) Complex Conformational Heterogeneity of the Highly Flexible O⁶-Benzylguanine DNA Adduct. *Chemical Research in Toxicology*, **27**, 1310-1325. <http://dx.doi.org/10.1021/tx500178x>
- [6] Sarlauskas, J., Miseviciene, L., Maroziene, A., *et al.* (2014) The Study of NADPH-Dependent Flavoenzyme-Catalyzed

- Reduction of Benzo[1,2-c]1,2,5-Oxadiazole N-Oxides (Benzofuroxans). *International Journal of Molecular Sciences*, **15**, 23307-23331. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms151223307>
- [7] Sarlauskas, J., Peciuikaityte, A.M., Miseviciene, L., *et al.* (2016) Naphtho[1',2':4,5]imidazo[1,2-a]pyridine-5, 6-diones: Synthesis, Enzymatic Reduction and Cytotoxic Activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **26**, 512-517. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.11.084>
- [8] Johnson, K.M., Parsons, Z.D., Barnes, C.L., *et al.* (2014) Toward Hypoxia-Selective DNA-Alkylating Agents Built by Grafting Nitrogen Mustards onto the Bioreductively Activated, Hypoxia Selective DNA-Oxidizing Agent 3-Amino-1,2,4-benzotriazine 1,4-Dioxide (Tirapazamine). *Journal of Organic Chemistry*, **79**, 7520-7531. <http://dx.doi.org/10.1021/jo501252p>
- [9] Cai, T.Y., Liu, X.W., Zhu, H., *et al.* (2014) Tirapazamine Sensitizes Hepatocellular Carcinoma Cells to Topoisomerase I Inhibitors via Cooperative Modulation of Hypoxia-Inducible Factor-1 α . *Molecular Cancer Therapeutics*, **13**, 630-642. <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0490>
- [10] Liapis, V., Labrinidis, A., Zinonos, I., *et al.* (2015) Hypoxia-Activated Pro-Drug TH-302 Exhibits Potent Tumor Suppressive Activity and Cooperates with Chemotherapy against Osteosarcoma. *Cancer Letters*, **357**, 160-169. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2014.11.020>
- [11] Sun, J.D., Liu, Q., Ahluwalia, D., *et al.* (2015) Efficacy and Safety of the Hypoxia-Activated Prodrug TH-302 in Combination with Gemcitabine and Nab-Paclitaxel in Human Tumor Xenograft Models of Pancreatic Cancer. *Cancer Biology & Therapy*, **16**, 438-449. <http://dx.doi.org/10.1080/15384047.2014.1003005>
- [12] Penketh, P.G., Shyam, K., Baumann, R.P., Ishiguro, K., Patridge, E.V., Zhu, R. and Sartorelli, A.C. (2012) A Strategy for Selective O⁶-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase Depletion under Hypoxic Conditions. *Chemical Biology & Drug Design*, **80**, 279-290. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1747-0285.2012.01401.x>
- [13] Zhu, R., Seow, H.A., Baumann, R.P., *et al.* (2012) Design of a Hypoxia-Activated Prodrug Inhibitor of O⁶-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **22**, 6242-6247. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.08.008>
- [14] Bai, J., Zhou, Y., Chen, Q., *et al.* (2015) Altering the Regioselectivity of a Nitroreductase in the Synthesis of Arylhydroxylamines by Structure-Based Engineering. *ChemBioChem*, **16**, 1219-1225. <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201500070>
- [15] Kilic, M. and Ensing, B. (2013) First and Second One-Electron Reduction of Lumiflavin in Water—A First Principles Molecular Dynamics Study. *Journal of Chemical Theory and Computation*, **9**, 3889-3899. <http://dx.doi.org/10.1021/ct400088g>
- [16] Silva, J.R., Roitberg, A.E. and Alver, C.N. (2015) A QM/MM Free Energy Study of the Oxidation Mechanism of Dihydroorotate Dehydrogenase (Class 1A) from *Lactococcus lactis*. *The Journal of Physical Chemistry B*, **119**, 1468-1473. <http://dx.doi.org/10.1021/jp512860r>
- [17] Nguyen-Tran, H.H., Zheng, G.W., Qian, X.H., *et al.* (2014) Highly Selective and Controllable Synthesis of Arylhydroxylamines by the Reduction of Nitroarenes with an Electron-Withdrawing Group Using a New Nitroreductase BaNTR1. *Chemical Communications*, **50**, 2861-2864. <http://dx.doi.org/10.1039/c3cc48590k>
- [18] Chua, C.K., Pumera, M. and Rulisek, L. (2012) Reduction Pathways of 2,4,6-Trinitrotoluene: An Electrochemical and Theoretical Study. *The Journal of Physical Chemistry C*, **116**, 4243-5251. <http://dx.doi.org/10.1021/jp209631x>
- [19] Maia, L.B. and Moura, J. (2014) How Biology Handles Nitrite. *Chemical Reviews*, **114**, 5273-5357. <http://dx.doi.org/10.1021/cr400518y>
- [20] Migliore, A., Polizzi, N.F., Therien, M.J., *et al.* (2014) Biochemistry and Theory of Proton-Coupled Electron Transfer. *Chemical Reviews*, **114**, 3381-3468. <http://dx.doi.org/10.1021/cr4006654>
- [21] Chen, X., Ma, G., Sun, W., *et al.* (2014) Water Promoting Electron Hole Transport between Tyrosine and Cysteine in Proteins via a Special Mechanism: Double Proton Coupled Electron Transfer. *Journal of the American Chemical Society*, **136**, 4515-4524. <http://dx.doi.org/10.1021/ja406340z>
- [22] Christofferson, A. and Wilkie, J. (2009) Mechanism of CB1954 Reduction by *Escherichia coli* Nitroreductase. *Biochemical Society Transactions*, **37**, 413-418. <http://dx.doi.org/10.1042/BST0370413>