

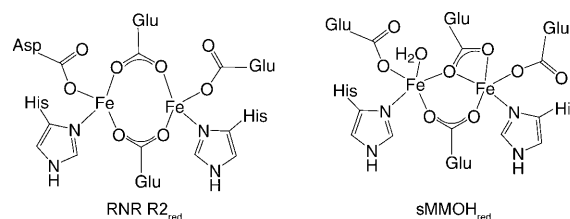
Carboxylatverbrückte Zweikernzentren in Oxygenasen: Dieisen, Dimangan oder doch besser heterozweikernig?

Arne Roth und Winfried Plass*

Bioanorganische Chemie · Eisen · Enzyme · Mangan · Metalloproteine

Carboxylatverbrückte Dieisenzentren sind ein in der Natur weit verbreitetes Strukturmotiv, und die entsprechenden Enzyme katalysieren ein breites Spektrum wichtiger Stoffwechselprozesse. Eine hochinteressante Familie von Dieisenproteinen zeichnet sich durch ein auffälliges Sekundärstrukturmotiv aus: Das zweikernige Zentrum ist zwischen einem Bündel von vier α -Helices lokalisiert (Vier-Helix-Bündel-Proteine), die über koordinierende Aminosäurereste (Histidinreste und Carboxylatgruppen von Glutamat- oder Aspartatresten) für die Bindung der Metallionen sorgen, welche über Carboxylatgruppen und/oder Oxoliganden (Wassermoleküle, Hydroxo- oder Oxoionen) miteinander verbrückt sind. Zu dieser Proteinfamilie zählen verschiedene Enzyme, die trotz ihrer ähnlich strukturierten Metallzentren sehr unterschiedliche biologische Prozesse katalysieren; dabei basieren diese verschiedenen Prozesse in den meisten Fällen jedoch auf einer gemeinsamen Reaktivität der Enzyme gegen molekularen Sauerstoff, der an den zweikernigen Metallzentren aktiviert und reduziert wird. Faszinierende und intensiv untersuchte Mitglieder dieser Familie sind die löslichen Methanmonooxygenasen (sMMO),^[1] die löslichen Fettsäure-desaturasen^[2] und die Ribonucleotid-Reduktasen (RNR) (Schema 1).^[3]

Aufgrund der gemeinsamen Reaktivität gegen Sauerstoff, verbunden mit der hochkonservierten Struktur des zweikernigen Metallzentrums und dessen Proteinumgebung von vier α -Helices, wird für diese Enzymfamilie ein gemeinsamer evolutionärer Ursprung in Form einer primitiven Oxidase vermutet. Die Aufgabe dieser ursprünglichen Oxidase könnte gewesen sein, Organismen durch schnelle und zuverlässige Reduktion von Sauerstoff vor dem oxidativen Stress zu schützen, der mit dem Übergang zu einer oxidierenden Atmosphäre vor etwa 2.5 Milliarden Jahren einherging. Diese Hypothese wurde unlängst durch ein Experiment untermauert, bei dem durch eine einzelne Punktmutation in einer löslichen Desaturase ein Verlust der Desaturaseaktivität bei



Schema 1. Aktive Dieisenzentren. Links: Protein R2 einer Ribonucleotid-Reduktase (RNR); rechts: Hydroxylase einer löslichen Methanmonooxygenase (sMMO).

gleichzeitiger Zunahme der Oxidaseaktivität erreicht werden konnte.^[4]

In jüngster Zeit wurden bakterielle Enzyme charakterisiert, die zwar Mitglieder dieser Proteinfamilie sind, sich jedoch von ihren prominenten Verwandten in verschiedenen Punkten deutlich unterscheiden. Dabei handelt es sich um die Ribonucleotid-Reduktase von *Chlamydia trachomatis*^[5] und die N-Oxygenase AurF von *Streptomyces thioluteus*.^[6] Eine offene Frage ist hierbei die nach der Identität der aktiven zweikernigen Metallzentren, wobei sowohl die beiden homometallischen Varianten als auch die heterometallische Eisen/Mangan-Variante diskutiert werden. Aus bioanorganischer Sicht ergibt sich die spannende Frage nach der Reaktivität der jeweiligen zweikernigen Metallzentren.

Nach heutigem Kenntnisstand wird die Desoxygenierung von Ribo- zu Desoxyribonucleotiden in allen Ribonucleotid-Reduktasen über die H-Abstraktion am Substrat durch ein Thiylradikal eines Cysteinrestes im aktiven Zentrum eingeleitet.^[3] Abhängig von der Art des zur Erzeugung dieses Schlüsselradikals verwendeten Metallcofaktors werden Ribonucleotid-Reduktasen in drei Klassen unterteilt: Während in Ribonucleotid-Reduktasen der Klassen II und III die Radikalbildung durch ein Cobalamin bzw. einen $\{Fe_4S_4\}$ -Cluster erfolgt, wird in Ribonucleotid-Reduktasen der Klasse I ein carboxylatverbrücktes Dieisenzentrum gefunden.

Ribonucleotid-Reduktasen der Klasse I sind Addukte aus einer R1-Untereinheit mit der Substratbindungsstelle und einer das Metallzentrum beherbergenden R2-Untereinheit. Das Enzym wird durch Reaktion von Disauerstoff mit dem reduzierten $\{Fe^{II}_2\}$ -Zentrum aktiviert, wobei als Produkt der Aktivierung eine kurzlebige gemischtvalente $\{Fe^{III}Fe^{IV}\}$ -Spezies (Intermediat X) angenommen wird (Abbildung 1a), die in der Lage ist, in unmittelbarer Nachbarschaft des Metall-

[*] Dr. A. Roth, Prof. Dr. W. Plass
Institut für Anorganische und Analytische Chemie
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Carl-Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena (Deutschland)
Fax: (+49) 3641-948-132
E-Mail: sekr.plass@uni-jena.de
Homepage: <http://www.acp.uni-jena.de>

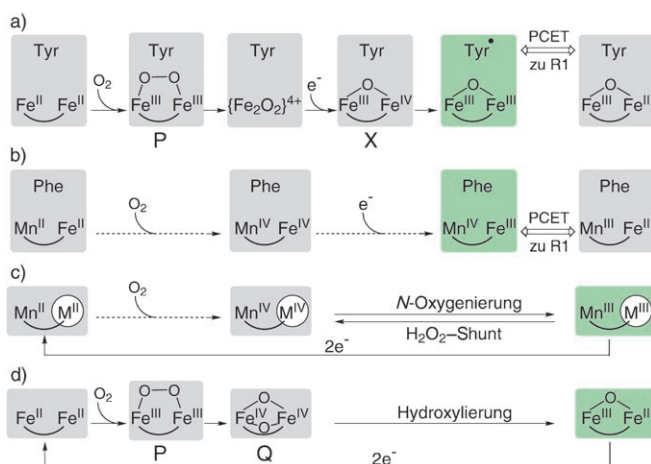


Abbildung 1. Reaktionsmechanismen verschiedener zweikerniger Oxygenasen: a) RNR R2 aus *E. coli*, b) RNR R2 aus *C. trachomatis*, c) AurF aus *S. thiolatus*, d) sMMOH. Stabile Produktzustände sind grün unterlegt. PCET = protonengekoppelter Elektronentransfer zwischen den Untereinheiten R1 und R2, M = Fe oder Mn.

zentrums ein langlebiges Tyrosylradikal zu erzeugen. Über eine komplexe Elektronentransferkette wird der Radikalcharakter des Tyrosinrestes auf einen Cysteinrest nahe der Substratbindungsstelle im aktiven Zentrum übertragen und die eigentliche enzymatische Reaktion gestartet.

Der Tyrosinrest spielt daher eine entscheidende Rolle für die Funktion der Ribonucleotid-Reduktasen der Klasse I und ist in den untersuchten Systemen hochkonserviert, weshalb er bis vor wenigen Jahren als essenziell für die Funktionsfähigkeit von Ribonucleotid-Reduktasen der Klasse I angesehen wurde, zumal in Mutationsexperimenten eine Substitution des Tyrosinrestes durch andere Aminosäurereste zu einer kompletten Desaktivierung führt.^[7] Jüngere Studien an pathogenen Bakterien der Gattung *Chlamydia* haben jedoch gezeigt, dass es alternative Wege der initialen Radikalbildung und der Übertragung des Radikalcharakters vom Metallzentrum zur Substratbindungsstelle geben muss. Aus Genomsequenzierungen verschiedener Vertreter dieser Gattung ist bekannt, dass diese Spezies ausschließlich Ribonucleotid-Reduktasen der Klasse I enthalten – allerdings fehlt im Unterschied zu den bisher bekannten Systemen der Tyrosinrest. Stattdessen enthält die Struktur der Ribonucleotid-Reduktase R2-Untereinheit von *C. trachomatis* im Kristall an der entsprechenden Position einen Phenylalaninrest; obwohl dieser kein ausreichend stabiles Radikal bilden kann,^[5] sind diese alternativen Ribonucleotid-Reduktasen aktiv (Abbildung 2).^[8]

Erste Studien zur Arbeitsweise dieser neuen Untergruppe der Ribonucleotid-Reduktasen der Klasse I ergaben, dass eine gemischtvalente Spezies ähnlich dem Intermediat X (Abbildung 1 a) vorliegt, die daher zunächst einem $\{\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{IV}}\}$ -Zentrum zugeordnet wurde.^[5,9] Aufgrund der Analogie des Elektronentransferpfads zwischen der R2- und der R1-Untereinheit mit dem in konventionellen Ribonucleotid-Reduktasen der Klasse I wurde postuliert, dass dieses gemischtvalente Metallzentrum die Rolle des Tyrosylradikals übernimmt, in Übereinstimmung mit der deutlich verlänger-

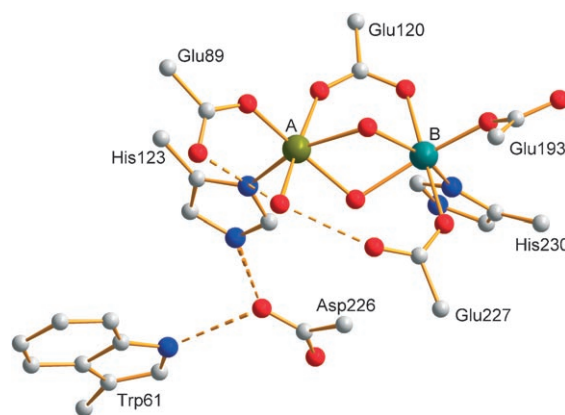


Abbildung 2. Aktives zweikerniges Zentrum der RNR-R2-Untereinheit von *C. trachomatis*; grau C, rot O, blau N. His123, Asp226 und Trp61 sind Teil des vorgeschlagenen Radikalübertragungspaths zur R1-Untereinheit. Mn/Fe-Zuordnung zu A und B siehe Text.

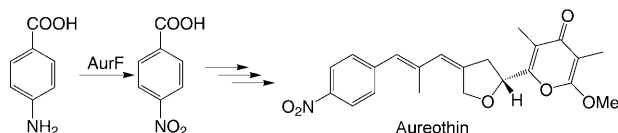
ten Lebensdauer des Intermediats X. Dieser scheinbare Mangel könnte den *Chlamydiae* als intrazellulären Parasiten sogar einen entscheidenden evolutionären Vorteil verschaffen, da mit dem Tyrosylradikal ein wichtiger Angriffspunkt für Stickstoffmonoxid (NO) fehlt, das im Rahmen der Abwehrreaktion des Wirts gebildet wird. Diese Vermutung wird durch den Befund gestützt, dass die gleiche Ribonucleotid-Reduktase-R2-Untereinheit in einer Reihe weiterer intrazellulärer Pathogene gefunden wurde.^[5]

In zwei unabhängigen Studien konnte jüngst nachgewiesen werden, dass nicht, wie ursprünglich angenommen, ein Dieisenzentrum, sondern ein heterozweikerniges $\{\text{MnFe}\}$ -Zentrum vorliegt.^[10,11] Die maximale Enzymaktivität wurde für ein Mn/Fe-Verhältnis von 1:1 und eine Gesamtmenge von etwa zwei Metallatomen pro Protein beobachtet.^[10] Basierend auf den Ergebnissen dieser Studien und den Kenntnissen über den allgemeinen Arbeitsmechanismus von Ribonucleotid-Reduktasen der Klasse I ist ein Ablauf der enzymatischen Reaktion von *Chlamydia*-Ribonucleotid-Reduktase wie in Abbildung 1 b gezeigt denkbar. Die hierbei postulierten Oxidationsstufen des heterozweikernigen $\{\text{MnFe}\}$ -Zentrums konnten eindrucksvoll durch EPR- und Mößbauer-spektroskopische Studien belegt werden. Als aktive Spezies wird ein dem Intermediat X analoges $\{\text{Mn}^{\text{IV}}\text{Fe}^{\text{III}}\}$ -Zentrum vermutet. Diese Studien haben auch gezeigt, dass bei weitergehender Reduktion der aktiven Spezies die Elektronenübertragung am Manganion des Metallzentrums stattfindet, das dann in der $\{\text{Mn}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}\}$ -Form vorliegt. Darüber hinaus gelang auch der Nachweis eines vorangehenden Intermediats bei der Aktivierung mit Disauerstoff, das ein oxidiertes $\{\text{Mn}^{\text{IV}}\text{Fe}^{\text{IV}}\}$ -Zentrum enthält.^[12] Die Bildung einer derartigen hochoxidierten Spezies wird für konventionelle Ribonucleotid-Reduktasen der Klasse I ebenso angenommen wie für verwandte Dieisenproteine wie MMOH und Fettsäuredesaturasen ($\{\text{Fe}^{\text{IV}}\}_2$, Intermediat Q in Abbildung 1 d).

Zwar ist die Vorstellung eines Mechanismus auf Basis eines heterozweikernigen $\{\text{MnFe}\}$ -Zentrums (Abbildung 1 b) allgemein akzeptiert, allerdings gibt es Unterschiede in der Interpretation der Reaktivitätsabstufung. Diese beziehen sich auf eine – wenn auch geringe – Restaktivität der ebenfalls

möglichen konventionellen Dieisenform des Enzyms. In Anbetracht der Besonderheit dieser neuen Gruppe von Ribonucleotid-Reduktasen der Klasse I (Verzicht auf den Tyrosinrest am Beginn der Elektronentransferkette) ist es jedoch plausibel, dass sich auch das Metallzentrum entsprechend seiner dadurch erweiterten Aufgabe als stabiler Radikalträger vom R2-Metallzentrum konventioneller Ribonucleotid-Reduktasen unterscheiden muss. Die Einführung eines Manganions ist also eine Anpassung an veränderte Anforderungen, weshalb es sehr wahrscheinlich ist, dass allein diese Form aktiv ist.

Ein zweites in diesem Zusammenhang interessantes Enzym ist die N-Oxygenase AurF, die ebenfalls zur großen Familie der Vier-Helix-Bündel-Proteine gehört und die N-Oxygenierung von *p*-Aminobenzoessäure zu *p*-Nitrobenzoessäure in der Biosynthese des Nitroaryl-substituierten Metaboliten Aureothin im Bakterium *S. thioluteus* katalysiert (Schema 2).^[13] In den bislang publizierten Studien erfolgten die In-vitro-Aktivitätstests an isoliertem AurF mit H₂O₂ als Oxidationsmittel, das Enzym nutzt unter nativen Bedingung jedoch sehr wahrscheinlich molekularen Sauerstoff für die Oxygenierung.^[14]



Schema 2. N-Oxygenierung von *p*-Aminobenzoessäure durch AurF in der Biosynthese von Aureothin.

Ähnlich wie bei der R2-Untereinheit der *Chlamydia*-Ribonucleotid-Reduktase wurde auch bei der N-Oxygenase AurF von *S. thioluteus* aufgrund von Sequenzhomologien vermutet, dass es sich bei dieser neuen Klasse von N-Oxygenasen um ein carboxylatverbrücktes Dieisenprotein handelt.^[15] Interessanterweise lassen EPR-Studien zwar auf die Präsenz einer heterometallischen {MnFe}-Spezies schließen, was jedoch von den Autoren auf Kontamination durch Manganionen im Medium zurückgeführt wurde.

Die kürzlich erfolgte Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von AurF gibt der Diskussion eine neue Wendung.^[6,14] Gemäß seiner Struktur gehört AurF der Familie der Vier-Helix-Bündel-Proteine an. Damit wurde die vermutete Verwandtschaft mit Dieisenenzymen zwar bestätigt, eine nähere Betrachtung des zweikernigen Zentrums von AurF macht jedoch wichtige Unterschiede deutlich (Abbildung 3): So wurde gefunden, dass die Aspartatreste (Asp135 und Asp226), die als Teil des Metall bindenden Motivs vorgeschlagen wurden, nicht nahe genug an den Metallzentren positioniert sind, um an der Komplexbildung mitzuwirken. Stattdessen enthält AurF in der Koordinationssphäre eines der beiden Metallionen einen zweiten Histidinrest, was eine koordinationschemische Besonderheit von AurF innerhalb der Vier-Helix-Bündel-Proteine ist, in denen gewöhnlich nur jeweils ein Histidinrest pro Metallion koordiniert.

Eine weitere Besonderheit offenbart AurF in Bezug auf die Identität der Metallzentren. Entgegen der bisherigen

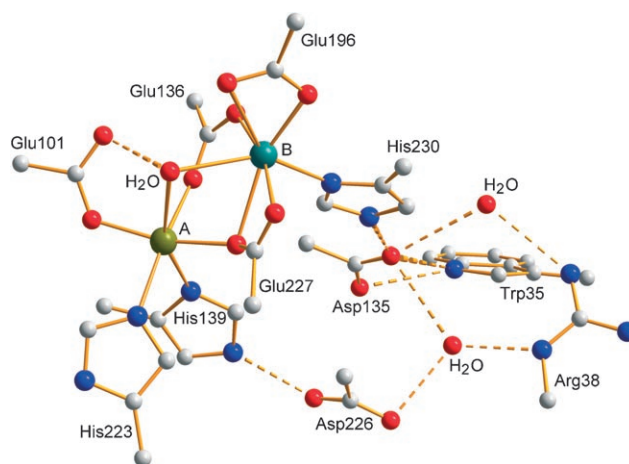


Abbildung 3. Aktives zweikerniges Zentrum der N-Oxygenase AurF von *S. thioluteus*; grau C, rot O, blau N. Asp135, Asp226, Trp35 und Arg38 sind Teil eines möglichen PCET-Pfades. Mn/Fe-Zuordnung zu A und B siehe Text.

Annahme konnten Hertweck et al. durch anomale Dispersioneffekte bei der Röntgenbeugung nachweisen, dass das zweikernige Zentrum aus zwei Manganionen besteht, wobei allerdings ein Eisengehalt von etwa 15% bestimmt wurde. In Übereinstimmung hiermit sind auch weitere Befunde der Autoren, die für eine bevorzugte Bindung von Mangan gegenüber Eisen durch das Protein sprechen. Die Spezifität des Proteins für Mangan wird auf den zusätzlichen Histidinrest zurückgeführt. Darüber hinaus deuten erste EPR-Messungen darauf hin, dass eine Manganspezies an der enzymatischen Reaktion beteiligt ist, da das manganspezifische Signal eine signifikante Veränderung bei der Reaktion mit H₂O₂ durchläuft.^[14]

Die Spezifität von AurF für Mangan ist erstaunlich, da es für die relevanten Bindungstaschen aus koordinationschemischer Sicht keine offenkundige Präferenz für eines der beiden Metallionen geben sollte. Hierfür sprechen auch Beobachtungen, dass es beispielsweise bei einer bakteriellen Ribonucleotid-Reduktase möglich ist, sowohl Eisen als auch Mangan einzubauen, wobei die Dimangan-Variante allerdings keine Aktivität aufweist.^[16] Eine mögliche Erklärung für die Mn-Spezifität könnte in der Differenzierung der beiden Metallionen in einem früheren Stadium des Proteinaufbaus, der spezifischen Proteinfaltung, liegen.^[17] Interessanterweise findet man auch für bekannte Dimangan-Enzyme – eine Katalase aus *Lactobacillus plantarum*^[18] und Arginase,^[19] die jedoch andere Reaktionen katalysieren – eine carboxylatreiche Bindungstasche, in der jedoch die beiden Manganionen jeweils lediglich durch einen Histidinrest koordiniert werden. Dies legt die Frage nahe, inwieweit der zusätzliche Histidinrest im aktiven Zentrum der N-Oxygenase AurF die Elementspezifität reguliert oder doch eher die funktionale Variation hin zur Aktivierung von Disauerstoff unterstützt.

Aus den ähnlichen spektroskopischen Eigenschaften von RNR R2 von *C. trachomatis* und der N-Oxygenase AurF von *S. thioluteus* haben nun Krebs et al. geschlossen, dass auch AurF ein heterozweikerniges {MnFe}-Zentrum aufweisen

sollte.^[20] Der aus dieser Analogie folgende Reaktionsablauf für die N-Oxygenase AurF ist in Abbildung 1 c gezeigt. Dabei wird durch Aktivierung mit Disauerstoff aus der $\{\text{Mn}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}\}$ -Spezies wahrscheinlich ein $\{\text{Mn}^{\text{IV}}\text{Fe}^{\text{IV}}\}$ -Intermediat gebildet, wie es auch im Falle der R2-Untereinheit von *C. trachomatis* beobachtet wird (Abbildung 1 b). Dieses $\{\text{Mn}^{\text{IV}}\text{Fe}^{\text{IV}}\}$ -Intermediat könnte das Substrat in einem Zweielektronenschritt oxidieren, was zu einem $\{\text{Mn}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}\}$ -Zentrum führt. In Analogie zu bakteriellen Mehrkomponenten-Monooxygenasen könnte dieser wieder in seine $\{\text{Mn}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}\}$ -Form überführt werden. Die von Hertweck et al. beobachtete katalytische Aktivität in Gegenwart von H_2O_2 könnte an der direkten Oxidation des $\{\text{Mn}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}\}$ -Zentrums unter Bildung des aktiven $\{\text{Mn}^{\text{IV}}\text{Fe}^{\text{IV}}\}$ -Intermediates liegen. Dieser so genannte Shunt-Pfad wird auch für Monooxygenasen wie sMMO oder P450 gefunden. Außer den mechanistischen Aspekten könnte der Vorschlag eines heterozweikernigen $\{\text{MnFe}\}$ -Zentrums auch den von Hertweck et al. nachgewiesenen Eisengehalt in den Proben erklären.

Nimmt man die Ergebnisse zusammen, kann man sogar versuchen, die Metallionen dem heterozweikernigen Zentrum in den Kristallstrukturen der RNR R2 von *C. trachomatis* und der N-Oxygenase AurF von *S. thioluteus* zuzuordnen; in beiden Fällen sollte die Position A dem Mangan- und die Position B dem Eisenion entsprechen (siehe Abbildungen 2 und 3). Im Falle der RNR R2 ist dies konsistent mit dem beobachteten ausschließlichen Wechsel der Oxidationsstufe für das Manganion ($\{\text{Mn}^{\text{IV}}\text{Fe}^{\text{III}}\} \leftrightarrow \{\text{Mn}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}\}$) im aktiven Zustand und der räumlichen Nähe dieser Position zur Elektronentransferkette (Asp226 und Trp61). Bei AurF könnte der zweite Histidinrest den koordinationschemischen Unterschied im für die Aktivierung von Disauerstoff vorgeschlagenen $\{\text{Mn}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}\}$ -Zentrum machen. Darüber hinaus spricht der Vergleich mit den Strukturen carboxylatverbrückter Dieisenzentren anderer Enzyme für das Vorliegen eines $\{\text{Mn}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}\}$ -Zentrums in RNR R2 und AurF, da in den reduzierten Dieisenenzymen mit zweiwertigen Metallionen – anders als bei RNR R2 und AurF – in der Regel eine reine Carboxylatverbrückung vorzufinden ist.

Auf der Basis ihrer Hypothese eines heterozweikernigen Metallzentrums haben Krebs et al. in neueren Datenbank-einträgen sieben weitere Proteine mit noch unbekannter Funktion gefunden, die entsprechend konservierte Aminosäurereste enthalten.^[20] Dies umfasst nicht nur die direkte Bindungstasche der beiden Metallionen (His139, His223, His230, Glu101, Glu136, Glu196 und Glu227), sondern auch aus anderen Systemen bekannte Partner für Wasserstoffbrücken (Asp226, Asp135, Trp35 und Arg38). Der zweite Fund ist bemerkenswert, da er einem typischen Strukturmotiv einer Elektronentransferkette der Klasse-I-Ribonucleotid-Reduktasen entspricht. Hierbei ist auch der an der Proteinoberfläche lokalisierte Argininrest (bis auf einen Fall, in dem ein Glutaminrest gefunden wird) hoch konserviert. Das legt die Vermutung nahe, dass diese auf der gegenüberliegenden Seite des Substratkanals befindliche Sequenz an der Elektronentransferkette zur reduktiven Rückbildung des $\{\text{Mn}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}\}$ -Ausgangszustands (siehe Abbildung 1 c) beteiligt ist.

Aufgrund der Sequenzenhomologie von AurF mit sieben weiteren Proteinen postulierten Krebs et al. AurF aus *S. thioluteus* als das erste Mitglied einer neuen Familie von Mangan/Eisen-Oxygenasen.^[20] Man darf gespannt sein, welche konkreten Funktionen die verwandten Proteine haben und wie viele weitere Mitglieder dieser Familie noch gefunden werden. Mit Sicherheit werden die vorgestellten Arbeiten die Suche nach geeigneten heterozweikernigen Modellen stimulieren und interessante neue Aspekte zur Reaktivität zweikerniger Enzyme zu Tage fördern.

Online veröffentlicht am 29. August 2008

- [1] M. Merckx, D. A. Kopp, M. H. Sazinsky, J. L. Blazyk, J. Müller, S. J. Lippard, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2860–2888; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2782–2807.
- [2] a) J. Shanklin, E. B. Cahoon, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1998**, *49*, 611–641; b) B. Behrouzian, P. H. Buist, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 577–582.
- [3] M. Kolberg, K. R. Strand, P. Graff, K. K. Andersson, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2004**, *1699*, 1–34.
- [4] J. E. Guy, I. A. Abreu, M. Moche, Y. Lindqvist, E. Whittle, J. Shanklin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 17220–17224.
- [5] M. Högbom, P. Stenmark, N. Voevodskaya, G. McClarty, A. Gräslund, P. Nordlund, *Science* **2004**, *305*, 245–248.
- [6] G. Zocher, R. Winkler, C. Hertweck, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* **2007**, *373*, 65–74.
- [7] S. Pötsch, F. Lendzian, R. Ingemarson, A. Hörnberg, L. Thelander, W. Lubitz, G. Lassmann, A. Gräslund, *J. Mol. Biol.* **1999**, *274*, 17696–17704.
- [8] C. Roshick, E. R. Iliffe-Lee, G. McClarty, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 38111–38119.
- [9] a) N. Voevodskaya, A.-J. Narvaez, V. Domkin, E. Torrents, L. Thelander, A. Gräslund, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 9850–9854; b) N. Voevodskaya, F. Lendzian, A. Gräslund, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *330*, 1213–1216.
- [10] W. Jiang, D. Yun, L. Saleh, E. W. Barr, G. Xing, L. M. Hoffart, M.-A. Maslak, C. Krebs, J. M. Bollinger, Jr., *Science* **2007**, *316*, 1188–1191.
- [11] N. Voevodskaya, F. Lendzian, A. Ehrenberg, A. Gräslund, *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 3351–3355.
- [12] W. Jiang, L. M. Hoffart, C. Krebs, J. M. Bollinger, Jr., *Biochemistry* **2007**, *46*, 8709–8716.
- [13] a) R. Winkler, C. Hertweck, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4152–4155; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4083–4087; b) J. He, C. Hertweck, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3694–3695; c) J. He, C. Hertweck, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 1225–1232.
- [14] R. Winkler, G. Zocher, I. Richter, T. Friedrich, G. E. Schulz, C. Hertweck, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8759–8762; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8605–8608.
- [15] M. Simurdiak, J. Lee, H. Zhao, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1169–1172.
- [16] a) B. S. Pierce, T. E. Elgren, M. P. Hendrich, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8748–8759; b) M. Högbom, Y. Huque, B.-M. Sjöberg, P. Nordlund, *Biochemistry* **2002**, *41*, 1381–1389.
- [17] M. W. Vetting, L. P. Wackett, L. Que, Jr., J. D. Lipscomb, D. H. Ohlendorf, *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 1945–1958.
- [18] V. V. Barynin, M. M. Whittaker, S. V. Antonyuk, V. S. Lamzin, P. M. Harrison, P. J. Artymiuk, J. W. Whittaker, *Structure* **2001**, *9*, 725–738.
- [19] D. E. Ash, *J. Nutr.* **2004**, *134*, 2760S–2764S.
- [20] C. Krebs, M. L. Matthews, W. Jiang, J. M. Bollinger, Jr., *Biochemistry* **2007**, *46*, 10413–10418.