

Analyse der magnetischen Eigenschaften des FeMo-Cofaktors der Nitrogenase mittels Einkristall-EPR-Spektroskopie**

Thomas Spatzal, Oliver Einsle* und Susana L. A. Andrade*

Professor Douglas C. Rees zum 60. Geburtstag gewidmet

Das Enzym Nitrogenase reduziert Distickstoff und eine Vielzahl weiterer Substrate an einem einzigartigen [Mo:7Fe:9S:C](R)-Homocitrat-Eisen-Molybdän-Cluster, dem FeMo-Cofaktor (FeMoco).^[1] Der Cluster wurde in großem Detail strukturell charakterisiert,^[2] aber seine funktionalen Eigenschaften und seine genaue Rolle bei der biologischen Stickstofffixierung bleiben unklar. Nitrogenase ist das einzige Enzym, das die reduktive Fixierung von atmosphärischem N₂ zu bioverfügbarem Ammonium (NH₄⁺) katalysiert, und es koppelt diese an die Produktion von H₂ und die Hydrolyse von ATP. Das Zweikomponenten-Metallo-enzym besteht aus den Komponenten MoFe-Protein (NifD₂K₂) und Fe-Protein (NifH₂) und setzt sich beim Substratumsatz dynamisch zusammen.^[3] Das Fe-Protein ist der Ort der ATP-Hydrolyse, und es dient als einziger Elektronendonator für das MoFe-Protein. Das $\alpha_2\beta_2$ -heterotetramere MoFe-Protein enthält je zwei Kopien des FeMoco und des im Elektronentransfer benötigten [8Fe:7S]-P-Clusters. Liganden des FeMoco sind ein Homocitrat-Molekül sowie zwei Aminosäureseitenketten, α -C275 und α -H442, im Enzym aus *Azotobacter vinelandii* (Abbildung 1 A). Der Cluster hat eine Pseudo- D_3 -Symmetrie, die nur durch das apikale Molybdänion gebrochen wird (Abbildung 1 B,C). Die sieben Eisenatome sind vierfach koordiniert, mit fast ideal tetraedrischer Geometrie. Das leichte Zentralatom im Cofaktorzentrums wurde erst vor kurzem als Kohlenstoff identifiziert, aber seine Funktion blieb bisher unklar.^[4]

Trotz jahrzehntelanger extensiver Untersuchungen bleiben die katalytischen und die zugehörigen magnetischen Eigenschaften des FeMoco weitgehend unverstanden. Nach

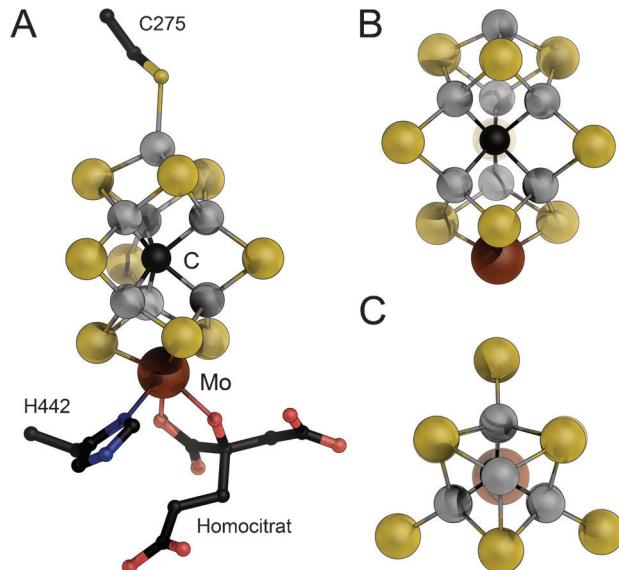


Abbildung 1. Struktur des FeMo-Cofaktors [Mo:7Fe:9S:C](R)-Homocitrat in der α -Untereinheit des Nitrogenase MoFe-Proteins aus *Azotobacter vinelandii*. A) Der Metallcluster wird durch zwei Aminosäurereste, α -C275 und α -H442, koordiniert. Fe grau, Mo braun, S gelb, C schwarz, N blau, O rot. B) Ansicht entlang der pseudozweizähligen Symmetrieachse. C) Ansicht entlang der dreizähligen Achse des FeMoco. (nach PDB-Eintrag 3U7Q).

Isolierung in Gegenwart von Dithionit enthält das MoFe-Protein den FeMoco im Grundzustand $S = 3/2$ (FeMoco^N).^[5] Chemische Oxidation führt mit einem reversiblen Übergang bei -42 mV in einen diamagnetischen Zustand (FeMoco^{Ox}), der durch Mößbauer- und MCD-Spektroskopie charakterisiert wurde, aber nicht unbedingt von physiologischer Relevanz sein muss.^[6] Unter Verwendung von Fe-Protein, nicht aber durch eine chemische oder elektrochemische Reduktion, kann FeMoco weiter in den Zustand von FeMoco^R ($S \geq 1$) reduziert werden.^[7] Bis heute ist der $S = 3/2$ -FeMoco^N bei weitem der am besten charakterisierte Zustand, mit umfangreichen Daten aus EPR-, Mößbauer-, ENDOR-, XANES- und EXAFS-Spektroskopie.^[5b,6c,8] Aus diesen Daten entstanden zwei gängige Hypothesen für die Verteilung der Elektronen innerhalb des Clusters.

Das erste Modell beschreibt die Oxidationszustände der Metallionen als [Mo⁴⁺:Fe³⁺:6Fe²⁺] während sich beim zweiten Modell, unterstützt durch ENDOR- und XANES-Daten, die Zuweisung [Mo⁴⁺:3Fe³⁺:4Fe²⁺] ergibt.^[8a,c,9] Da sowohl die exakte elektronische Konfiguration als auch die Redoxzustandsbestimmungen der einzelnen Atome umstritten sind,

[*] Dr. T. Spatzal, [+] Prof. O. Einsle, Prof. S. L. A. Andrade
Institut für Biochemie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Albertstraße 21, 79104 Freiburg (Deutschland)
und
BIOS Centre for Biological Signalling Studies
Hebelstraße 25, 79104 Freiburg (Deutschland)
E-Mail: einsle@bio.chemie.uni-freiburg.de
andrade@bio.chemie.uni-freiburg.de
Homepage: <http://portal.uni-freiburg.de/biochemie>

[+] Aktuelle Adresse: Howard Hughes Medical Institute (HHMI)
and Division of Chemistry and Chemical Engineering
California Institute of Technology
1200 E. California Blvd., Pasadena CA 91125 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Sachbeihilfe AN 676/3 für S.L.A.A., Sachbeihilfe EI 520/7 für O.E.) und den Europäischen Forschungsrat unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201303000> zu finden.

konnte bislang keine allgemein akzeptierte theoretische Beschreibung der exakten Spinkopplung erreicht werden. DFT-Rechnungen, basierend auf einem „Broken-symmetry“-Zugang (BS), wurden genutzt, um Information über die spezifische Spinkopplung des FeMoco zu erhalten.^[8c, 9a, 10] Bei einem Spinzustand von $S = 3/2$ und einer angenommenen Konfiguration $[\text{Mo}^{4+} \cdot 3\text{Fe}^{3+} \cdot 4\text{Fe}^{2+}]$ sind 10 verschiedene Spinkonfigurationen möglich, die alle in einer 4(up)/3(down)-Kopplung resultieren, wobei das BS7-Kopplungsschema die experimentellen Daten am besten beschreibt.^[11] Das interstitielle Kohlenstoffatom im Cluster wurde aber weder in diesen Rechnungen noch in früheren Analysen experimenteller Daten berücksichtigt.^[4]

EPR-Spektroskopie ist ausgezeichnet geeignet, um Informationen über die exakten magnetischen Eigenschaften eines Metallzentrums zu gewinnen. Angewendet auf geordnete Einkristalle ermöglicht diese Technik die Bestimmung der relativen Orientierung der Hauptachsen des magnetischen **g**-Tensors eines paramagnetischen Zentrums in Beziehung zu dessen Struktur.

Einkristalle des MoFe-Proteins aus *Clostridium pasteurianum* wurden bereits früher von Hoffman und Mitarbeitern EPR-spektroskopisch untersucht, wobei aber zu jener Zeit keine dreidimensionale Strukturinformationen vorhanden war.^[12] Wir berichten hier über die Analyse von Einkristall-EPR-Messungen an MoFe-Protein aus *Azotobacter vinelandii*, die in Kombination mit Röntgenkristallographie die Orientierung des magnetischen **g**-Tensors bezüglich der FeMoco-Geometrie definiert. Die Messungen wurden im X-Band mit Dithionit-reduzierten MoFe-Proteinkristallen mit einer Größe von etwa $1.0 \times 0.8 \times 0.8 \text{ mm}^3$ durchgeführt. Die Hauptachsen des **g**-Tensors im $S = 3/2$ -FeMoco^N-Zustand sind aus Pulverspektren bestimmt zu $g_x = 2.01$, $g_y = 3.65$ und $g_z = 4.31$, was durch eine Simulation basierend auf einem $M_s = \pm 1/2$ -Kramers-Dublett-Übergang mit einer Rhombizität von $E/D = 0.053$ sehr gut wiedergegeben wird. Dieses Signal geht ausschließlich auf den FeMoco zurück, da alle Fe-Ionen des P^N-Clusters im Fe^{II}-Zustand sind, und der Cluster daher diamagnetisch ist.

MoFe-Protein kristallisierte in der monoklinen Raumgruppe $P2_1$, mit einem oder zwei Heterotetrameren pro asymmetrischer Einheit und zwei asymmetrischen Einheiten in der Elementarzelle. Im Fall der größeren Elementarzelle war die nichtkristallographische Symmetrieroberung zwischen beiden Tetrameren eine nahezu reine Translation, sodass in beiden Zellen maximal vier magnetisch unabhängige Resonanzen beobachtet wurden (Abbildung 2). Bedingt durch die zufällige Orientierung eines Kristalls mit einer Fläche der Elementarzelle senkrecht zum magnetischen Feldvektor B_1 war die Zahl der Resonanzbanden auf zwei reduziert, was zu einer signifikanten Vereinfachung der Auswertung dieser Datensätze führte. Die Kristalle zeigten eine markante Winkelabhängigkeit der EPR-Signale innerhalb der Grenzen der Hauptachsen des **g**-Tensors (Abbildung 2A, Abbildung 3A), sowie die erwartete Sinusform der **g**²-Werte mit einer Periodizität von 180° (Abbildung 2B,C).

Aufgrund von **g**-Strain wurde häufig eine orientierungsabhängige Linienverbreiterung des EPR-Signals im Hochfeldbereich beobachtet (Abbildung 3A).^[12] Um die Signal-

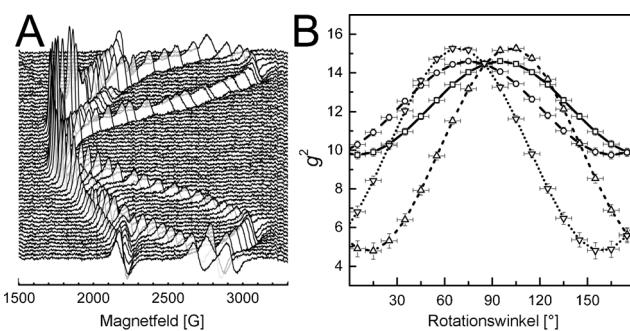


Abbildung 2. Einkristall-EPR-Messungen. A) X-Band-Spektren eines *A.vinelandii*-MoFe-Proteinkristalls, aufgenommen in 3° -Schritten über einen Bereich von 180° . Vier EPR-Signale repräsentieren die magnetisch unterscheidbaren Metallzentren in der Elementarzelle des Kristalls. B) Anpassung von Sinuskurven für die g^2 -Werte aller Signale. Die Symbole repräsentieren die vier magnetisch unterscheidbaren FeMo-Cofaktoren in der Elementarzelle.

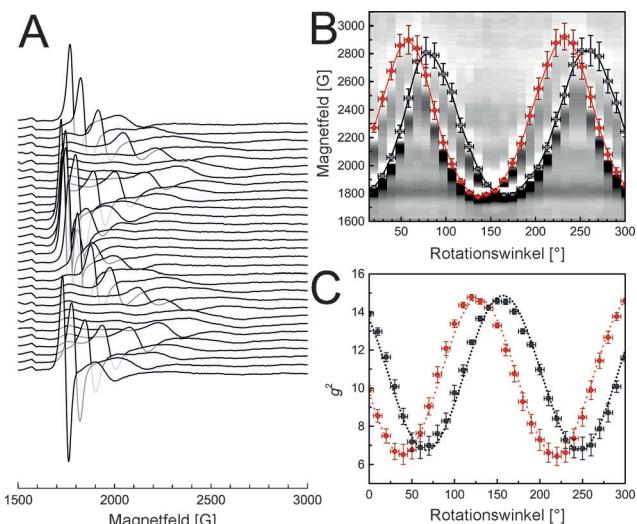


Abbildung 3. A) Symmetriereduzierte Einkristall-X-Band-Spektren des MoFe-Proteins, aufgenommen über einen Bereich von 300° . Zwei Resonanzen – entsprechend nur zwei magnetisch unterscheidbaren Zentren – werden aufgelöst, da die Rotationsachse parallel zur b -Achse des Kristalls steht. B) Winkelabhängigkeit des EPR-Signals, abgeleitet aus den Spektren und überlagert mit einem 2D-Konturdiagramm. Der Fehler in x hat technische Gründe, insbesondere bedingt durch den Spielraum der Kapillare im EPR-Probenröhrchen, während die y -Achsen-Fehler, bestimmt als Linienbreite bei halbmaximaler Höhe, auf Linienverbreiterung zurückzuführen sind. C) Sinuskurven-Anpassung der g^2 -Werte, analog zu Abbildung 2 B. Die Symbole repräsentieren die beiden magnetisch unterscheidbaren FeMo-Cofaktoren in der Elementarzelle.

positionen der einzelnen Spektren genauer zu ermitteln, wurden daher zweidimensionale Konturdiagramme generiert (Abbildung 3B) und im Bereich höheren Felds auch die Diagramme der ersten beiden Ableitungen untersucht. Die Signalpositionen wurden primär aus den Maxima der integrierten Spektren ermittelt. Die erhaltenen Daten wurden dann zur Anpassung der Winkelabhängigkeit der Resonanzposition genutzt. Dies geschah unter Verwendung des EPR-Simulationsprogramms „easyspin“, mit den eingebetteten Funktionen „resfield“ und „pepper“.^[13] Die Simulation lie-

ferte die Orientierungen der einzelnen **g**-Tensoren relativ zu einem spezifischen Bezugsrahmen der Simulation, korrelierend mit der räumlichen Orientierung des FeMoco. Die Auswertung der Spektren und Bestimmung der relativen Orientierungen wird in den Hintergrundinformationen detailliert beschrieben. Erst die Kombination zweier Datensätze (Abbildung 2, Abbildung 3) ermöglichte die eindeutige Bestimmung der **g**-Tensor-Orientierung im Bezug zur dessen Struktur (Abbildung S1, S4).

Die $g_z = 4.31$ -Komponente weicht lediglich um 4.5° von der dreizähligen Achse des FeMoco ab. Dies ist aufgrund des Spielraums der Kristallkapillare im EPR-Probenröhrchen innerhalb des experimentellen Fehlers. Gleichermaßen liegt die $g_y = 3.65$ -Komponente nur um 16.5° außerhalb der Fe1-C-S5-Ebene des Cofaktors. Da die Orientierung des magnetischen Tensors vor allem durch die atomare und elektronische Struktur des FeMoco bestimmt wird ist offensichtlich, dass das beobachtete, rhombische Pulverspektrum die Pseudo- D_3 -Symmetrie des Clusters nicht vollständig wiedergeben kann. Isolierter FeMo-Cofaktor behält seinen Spinzustand von $S = 3/2$ bei großer Rhombizität in der Abwesenheit jeglicher Proteinliganden bei,^[14] während ein isolierter [8Fe:9S:C]-Vorläufer, der noch kein Molybdänion enthält, ein $S = 1/2$ -System ist.^[15] Das Heterometall spielt damit vermutlich eine wesentliche Rolle für das Entstehen der hohen Rhombizität des $S = 3/2$ -Systems, ebenso aber auch die direkte und asymmetrische Koordination durch Homocitrat und H442. Dennoch wird im direkten Vergleich mit Holo-MoFe-Protein ein zusätzlicher Einfluss der Proteinumgebung und des elektrostatischen Potentialfelds deutlich.^[14] Mo unterstützt die Ausrichtung der g_z -Achse entlang der dreizähligen Rotationsachse des Clusters, und die umliegenden Aminosäuren bewirken die Feinabstimmung von g_x und g_y . Die g_x - g_y -Ebene liegt nahe an der aus den Atomen Fe1-Fe3-S5-Fe7-Mo gebildeten Kante des FeMoco (Abbildung 4) und bricht damit die dreizählige Rotationssymmetrie des Clusters.

FeMo-Cofaktor ist in einer Bindetasche eingebettet, die vorwiegend von hydrophoben Aminosäuren gebildet wird, mit Ausnahme einer kleinen hydrophilen Tasche bei Fe3, die

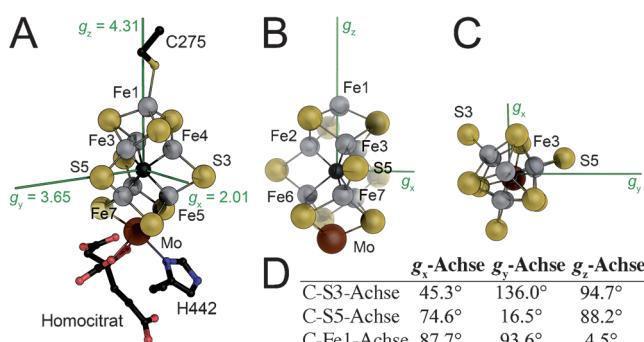


Abbildung 4. Orientierung des **g**-Tensors relative zum FeMo-Cofaktor. A) Gesamtansicht einschließlich der ersten Ligandensphäre des Zentrums. Die g_z -Komponente weicht lediglich um 4.5° von der dreizähligen Achse des Clusters ab. B) Ansicht entlang g_y . C) Ansicht des Clusters entlang g_x . Die g_y -Achse weicht um 16.5° von der Fe1-Fe3-S5-Fe7-Mo-Kante des Clusters ab. D) Übersicht der durch die Hauptachsen des **g**-Tensors und die intrinsischen Achsen des FeMoco aufgespannten Winkel.

in der Struktur des MoFe-Proteins bei einer Auflösung von 1.0 \AA vier definierte Wassermoleküle enthält.^[4b] Nur wenige mögliche Elektronendonatorliganden finden sich hier, nämlich α -Arg96, α -His195, α -Arg359 und α -His442 (Abbildung 5).

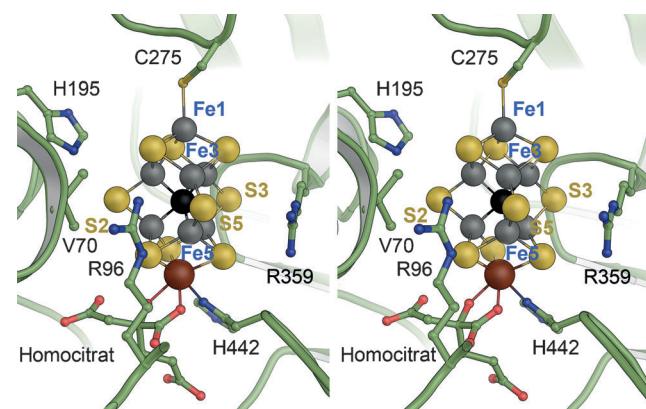


Abbildung 5. Mögliche Elektronendonatorliganden am FeMo-Cofaktor des MoFe-Proteins der Nitrogenase. Lediglich die Reste C275 und H442 sind direkte Liganden, aber die konservierten R96, H195 und R359 erzeugen eine anisotrope elektrostatische Umgebung, welche die **g**-Tensor-Orientierung beeinflusst. Insbesondere ist die g_z -Achse entlang der Fe1-Fe3-Fe7-Mo-Kante des Clusters ausgerichtet, die ihrerseits von den positiv geladenen Guanidinogruppen von R96 und R359 umgeben ist. Die Abbildung basiert auf dem PDB-Eintrag 3U7Q.

Die positiv geladenen Guanidinogruppen der beiden Argininreste befinden sich auf beiden Seiten der Fe1-Fe3-S5-Fe7-Mo-Kante des Clusters und erzeugen eine lokale elektrostatische Potentialumgebung, die sich auf die elektronische Struktur des FeMo-Cofaktors auswirkt (Abbildung 5). Die einzigen Aminosäuren, die FeMoco direkt koordinieren, sind α -C275 und α -H442, ergänzt durch das organische (*R*)-Homocitrat (Abbildung 1A). Die hohe Symmetrie des FeMo-Cofaktors erschwert die eindeutige Zuordnung einer Substratbindestelle auf der Oberfläche, und bislang wurde die Bindung eines Liganden im Wildtyp-Protein noch nicht direkt beobachtet. Untersuchungen einer α -V70-Variante deuten dort auf Substrat- und Inhibitorenbindung an Fe6 hin. Diese Daten werden insbesondere durch Experimente gestützt, in denen nach ^{13}CO -Inkubation in ENDOR-Studien eine Kopplung des ^{13}C -Kernspins an den Elektronenspin des Clusters beobachtet wurde,^[16] aber diese Analyse ist zwangsläufig stark vom verwendeten elektronischen Modell abhängig. Unsere vorliegenden Daten platzieren das auf der zum Rest α -H195 hingewandten Seite des Clusters liegende Fe6 nahe der g_x -Achse des Tensors.

Das Fehlen einer zufriedenstellenden theoretischen Beschreibung der elektronischen Struktur des FeMo-Cofaktors macht derzeit die Erhebung weiterer experimenteller Daten als Basis für verfeinerte computergestützte Ansätze notwendig. Die hier genutzte Kombination von Röntgenbeugungs- und Einkristall-EPR-Daten von Dithionit-reduziertem MoFe-Protein aus *A. vinelandii* zeigte erstmals die räumliche Orientierung des **g**-Tensors im $S = 3/2$ -FeMoco^N-Zustand relativ zur Struktur. Diese Informationen können in zukünftige DFT-Rechnungen zu einer Verbesserung der Qualität der

vorliegenden elektronischen Modelle führen. Eine verfeinerte elektronische Struktur wird eine exaktere Beschreibung der Elektronenverteilung innerhalb des Clusters sowie des daraus resultierenden Kopplungsverhaltens ermöglichen. Ziel ist ein besseres Verständnis des Elektronentransfers im MoFe-Protein und letztlich auch der Substratbindung und -aktivierung am FeMo-Cofaktor.

Experimentelles

Zellwachstum und Proteinreinigung: *Azobacter vinelandii* (Lipman 1903) wurde auf Burkes Medium in 500-mL-Flaschen gezogen. Das Kulturmedium wurde mit 10 mM NH₄Cl als einziger fester Stickstoffquelle supplementiert. Hauptkulturen wurden mit 1.3 mM NH₄Cl versetzt, was nach Verbrauch von Ammonium zu Derepression der Nitrogenase-Genexpression führte. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei einer optischen Dichte von 0.30 (OD_{600nm}) geerntet. Die Zellpaste wurde mit einem Puffer aus 50 mM Tris/HCl (pH 7.4) gewaschen. Alle nachfolgenden Schritte wurden durchgeführt wie beschrieben.^[2]

Proteinkristallisation: Alle Kristallisationsversuche wurden unter anoxischen Bedingungen (95% N₂/5% H₂, <5 ppm O₂) durchgeführt. 12 µL Proteineinlösung (65 mg mL⁻¹) wurden mit der gleichen Menge Reservoirlösung aus 0.7 M NaCl, 17.0 Vol.-% PEG 4000, 3% Vol.-% MPD, 0.2 M Imidazol-Malat-Puffer (pH 8.0), 0.55 mM Spermin und 0.1 mM Zwittergent 3-14 (Hampton Research) gemischt. Alle kristallographischen Schritte wurden bei 291 K unter Anwendung der Dampfdiffusionsmethode mit sitzenden Tropfen durchgeführt.^[4b]

Röntgenkristallographie: Kristalle wurden in dünnwandige (10 µm) Quarzkapillaren montiert, die mit einer Ausgangsposition für die Röntgen- und EPR-Datensammlung markiert wurden. Röntgenbeugungsmessungen wurden auf einem MicroMax-007HF-Röntgengenerator mit einem Saturn-944+-CCD-Detektor (Rigaku) bei 100 K durchgeführt. Die Daten wurden wie früher beschrieben behandelt.^[4b]

EPR-Spektroskopie und Datenanalyse: Nach der Röntgen-Datensammlung wurden die Kapillaren in X-Band-EPR-Röhrchen verbracht, die dann mit einem Puffer aus 50 mM Tris/HCl (pH 7.4), 200 mM NaCl und 5 mM Na₂S₂O₈ aufgefüllt wurden. Die Spektren wurden auf einem Bruker-Elexsys-E500-X-Band-Spektrometer, ausgestattet mit einem Heliumkryostat (Oxford Instruments) bei 7 K aufgezeichnet; Mikrowellenfrequenz 9.340 GHz; Mikrowellenleistung 50 mW, Feldmodulation 100 kHz, Modulationsamplitude 8 G, Zeitkonstante 328 ms, Abtastfrequenz 179 G min⁻¹.

Eingegangen am 10. April 2013,
veränderte Fassung am 11. Juni 2013
Online veröffentlicht am 8. August 2013

Stichwörter: Biologische Stickstofffixierung ·
EPR-Spektroskopie · FeMo-Cofaktor · g-Tensor ·
Magnetische Eigenschaften

[1] a) J. B. Howard, D. C. Rees, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2965–2982;
b) D. C. Rees, F. A. Tezcan, C. A. Haynes, M. Y. Walton, S.

Andrade, O. Einsle, J. B. Howard, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **2005**, *363*, 971–984.

- [2] O. Einsle, F. A. Tezcan, S. L. A. Andrade, B. Schmid, M. Yoshida, J. B. Howard, D. C. Rees, *Science* **2002**, *297*, 1696–1700.
- [3] L. C. Seefeldt, B. M. Hoffman, D. R. Dean, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 701–722.
- [4] a) K. M. Lancaster, M. Roemelt, P. Ettenhuber, Y. L. Hu, M. W. Ribbe, F. Neese, U. Bergmann, S. DeBeer, *Science* **2011**, *334*, 974–977; b) T. Spatzal, M. Aksoyoglu, L. M. Zhang, S. L. A. Andrade, E. Schleicher, S. Weber, D. C. Rees, O. Einsle, *Science* **2011**, *334*, 940–940.
- [5] a) J. M. Chan, J. Christiansen, D. R. Dean, L. C. Seefeldt, *Biochemistry* **1999**, *38*, 5779–5785; b) J. Rawlings, V. K. Shah, J. R. Chisnell, W. J. Brill, R. Zimmermann, E. Münck, W. H. Orme-Johnson, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 1001–1004; c) V. K. Shah, W. J. Brill, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 3438–3440.
- [6] a) H. C. Angove, S. J. Yoo, E. Munck, B. K. Burgess, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 26330–26337; b) B. H. Huynh, E. Münck, W. H. Orme-Johnson, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct.* **1979**, *576*, 192–203; c) M. K. Johnson, A. J. Thomson, A. E. Robinson, B. E. Smith, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct.* **1981**, *671*, 61–70; d) S. J. Yoo, H. C. Angove, V. Papaeftymiou, B. K. Burgess, E. Münck, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4926–4936.
- [7] a) B. H. Huynh, M. T. Henzl, J. A. Christner, R. Zimmermann, W. H. Orme-Johnson, E. Münck, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct.* **1980**, *623*, 124–138; b) W. E. Newton, S. F. Gheller, B. J. Feldman, W. R. Dunham, F. A. Schultz, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 1924–1927.
- [8] a) H. B. I. Liu, A. Filippini, N. Gavini, B. K. Burgess, B. Hedman, A. Dicicco, C. R. Natoli, K. O. Hodgson, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2418–2423; b) A. J. Pierik, H. Wassink, H. Haaker, W. R. Hagen, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *212*, 51–61; c) V. Vrajmasu, E. Münck, E. L. Bominaar, *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 5974–5988.
- [9] a) T. Lovell, T. Q. Liu, D. A. Case, L. Noddleman, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8377–8383; b) H. I. Lee, B. J. Hales, B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11395–11400.
- [10] S. J. Yoo, H. C. Angove, B. K. Burgess, M. P. Hendrich, E. Munck, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2534–2545.
- [11] a) T. Lovell, J. Li, T. Q. Liu, D. A. Case, L. Noddleman, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12392–12410; b) L. Noddleman, C. Y. Peng, D. A. Case, J. M. Mouesca, *Coord. Chem. Rev.* **1995**, *144*, 199–244; c) L. Noddleman, *J. Chem. Phys.* **1981**, *74*, 5737–5743; d) J. M. Mouesca, L. Noddleman, D. A. Case, B. Lamotte, *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 4347–4359; e) J. M. Mouesca, L. Noddleman, D. A. Case, *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 4819–4830.
- [12] R. J. Gurbel, J. T. Bolin, A. E. Ronco, L. Mortenson, B. M. Hoffman, *J. Magn. Reson.* **1991**, *91*, 227–240.
- [13] S. Stoll, A. Schweiger, *J. Magn. Reson.* **2006**, *178*, 42–55.
- [14] A. W. Fay, M. A. Blank, C. C. Lee, Y. L. Hu, K. O. Hodgson, B. Hedman, M. W. Ribbe, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12612–12618.
- [15] A. W. Fay, M. A. Blank, C. C. Lee, Y. L. Hu, K. O. Hodgson, B. Hedman, M. W. Ribbe, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 7933–7936; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7787–7790.
- [16] H. I. Lee, L. M. Cameron, B. J. Hales, B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10121–10126.