

Biometallorganische Chemie mit IspG und IspH: Struktur, Funktion und Hemmung der an der Isoprenoid-Biosynthese beteiligten $[Fe_4S_4]$ -Proteine

Weixue Wang und Eric Oldfield*

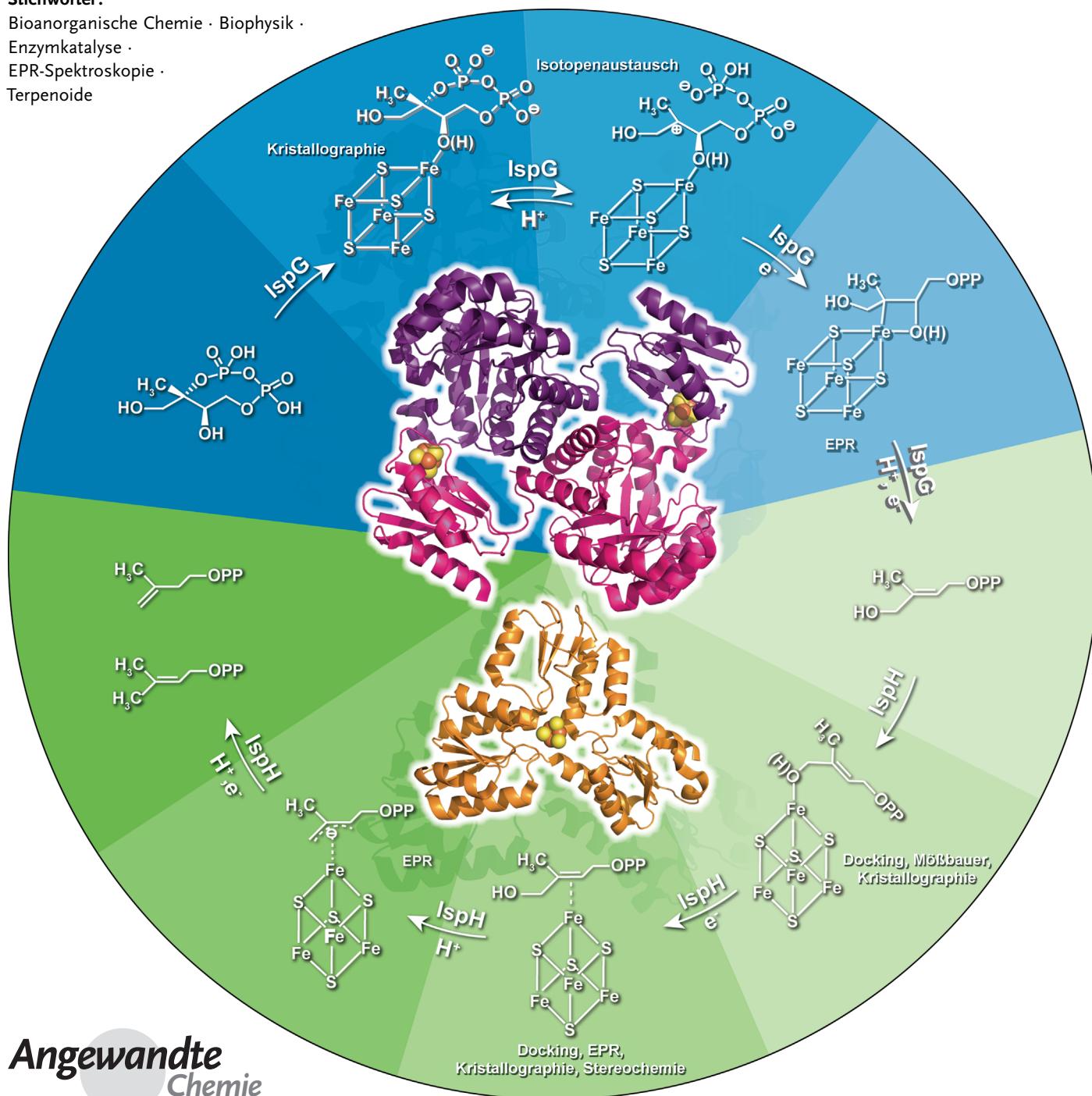
Stichwörter:

Bioanorganische Chemie · Biophysik ·

Enzymkatalyse ·

EPR-Spektroskopie ·

Terpenoide



Enzyme des Methylerythritolphosphat-Weges sind eine attraktive Angriffsstelle für Antiinfektiva. Die letzten beiden Enzyme dieses Biosyntheseweges, IspG und IspH, sind $[Fe_4S_4]$ -Proteine, die über neuartige Mechanismen $2H^+/2e^-$ -Reduktionen katalysieren und vom Menschen nicht gebildet werden. In diesem Aufsatz fassen wir aktuelle Fortschritte der strukturellen, mechanistischen und inhibitorischen Studien zu diesen beiden Enzymen zusammen. Insbesondere werden mechanistische Vorschläge mit biometallorganischen Zwischenstufen vorgestellt und mit anderen mechanistischen Möglichkeiten verglichen. Auf Substratanaloga basierende Inhibitoren, die durch rationale Überlegungen und das Screening von Substanzbibliotheken entwickelt wurden, werden diskutiert. Die präsentierten Ergebnisse untermauern die biometallorganischen Katalysemechanismen für IspG und IspH und eröffnen Perspektiven für die Entwicklung von Inhibitoren, die auf $[Fe_4S_4]$ -Cluster in Proteinen zielen.

Aus dem Inhalt

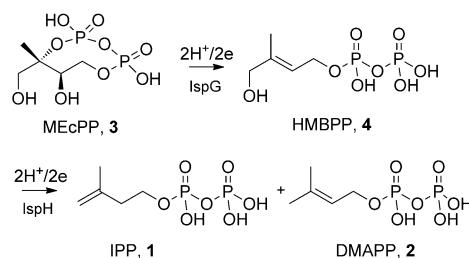
1. Einführung	4383
2. Strukturen von IspH und IspG	4384
3. Die katalytischen Mechanismen von IspH	4387
4. Die katalytischen Mechanismen für IspG	4391
5. IspH- und IspG-Inhibitoren	4394
6. IspH ist auch eine Alkin-Hydrolase	4396
7. Zusammenfassung und Ausblick	4397

1. Einführung

Eisen-Schwefel-Proteine mit $[Fe_4S_4]$ -Clustern^[1] führen bemerkenswert vielseitige Reaktionen durch, die vom Elektronentransfer (in Ferredoxinen),^[2,3] über Dehydratisierung/Isomerisierung (in z.B. der Aconitase im Krebs-Zyklus),^[4,5] bis hin zu Radikalreaktionen durch Enzyme der S-Adenosylmethionin(SAM)-Superfamilie reichen.^[6] Kürzlich wurde eine weitere Klasse der $[Fe_4S_4]$ -Proteine entdeckt, welche die Bildung zweier wichtiger Zwischenprodukte der Isoprenoid-Biosynthese katalysieren: Isopentenyldiphosphat (IPP, **1**; Schema 1) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP, **2**). Die

die wiederum bei der Biosynthese der bakteriellen Zellwand, der Chinon-Biosynthese und der Protein-Prenylierung verwendet werden.^[7-9] Da dieser Weg bei Menschen (die den Mevalonat-Weg für die Isoprenoid-Biosynthese nutzen) nicht vorkommt, sind IspG und IspH als neue Wirkstoff-Angriffspunkte interessant.^[10] Beide Proteine sind auch in den Plastiden von Pflanzen vorhanden, wo sie in die Biosynthese von Chinon, Chlorophyll (Phytol) und Carotenoiden eingebunden sind^[8,11] und daher als Ziele für neuartige Herbizide dienen.^[11] Die Funktionsweise dieser Proteine blieb jedoch lange Jahre rätselhaft, da sie sowohl die Elektronenübertragungsreaktionen (wie Ferredoxine) als auch die Substrat-Dehydroxylierung katalysieren müssen.

In diesem Aufsatz behandeln wir drei Hauptthemen: 1) die Strukturen von IspG und IspH, 2) die katalytischen Mechanismen von IspG und IspH und 3) die Inhibierung von IspG und IspH. Die beschriebenen Ergebnisse belegen eine direkte Funktion des $[Fe_4S_4]$ -Clusters innerhalb der Katalyse und der Inhibierung. Besonders das spezielle vierte Fe des $[Fe_4S_4]$ -Clusters ist an der Bildung „biometallorganischer“ π -, η^3 -Allyl- oder Ferraoxetan-Reaktionszwischenstufen beteiligt, aber auch Inhibitoren binden an die $[Fe_4S_4]$ -Cluster (und reagieren in einigen Fällen mit diesen). Diese Ergebnisse führen nicht nur zu einzigartigen enzymkatalysierten Reaktionsmechanismen, sondern liefern auch Hinweise für die Entwicklung neuer Inhibitoren, die als neue Leitstrukturen für Arzneistoffe und Herbizide interessant sind.



Schema 1. Durch IspG und IspH katalysierte Reaktionen.

beteiligten Reaktionen sind die $2H^+/2e^-$ -Reduktion von 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclo-diphosphat (MEcPP, **3**) zu (*E*)-1-Hydroxy-2-methylbut-2-enyl-4-diphosphat (HMBPP, **4**), katalysiert durch IspG (auch bekannt als GcpE), und die $2H^+/2e^-$ -Reduktion von **4** zur Bildung von **1** und **2**, katalysiert durch IspH (auch bekannt als LytB). IspG und IspH sind an dem vor rund 20 Jahren entdeckten Methylerythritolphosphat(MEP)-Weg der Isoprenoid-Biosynthese (auch bekannt als Nicht-Mevalonat-Weg) beteiligt.^[7] Sie sind essentiell für das Überleben der meisten Bakterien sowie der Malaria-Parasiten, *Plasmodium* spp., da **1** und **2** zur Bildung von Undecaprenyl- und Decaprenyldiphosphaten benötigt werden,

[*] Prof. Dr. E. Oldfield

Department of Chemistry and Center for Biophysics and Computational Biology, University of Illinois at Urbana-Champaign
600 South Mathews Avenue, Urbana, IL 61801 (USA)
E-Mail: eo@chad.scs.uiuc.edu

Dr. W. Wang

Department of Chemistry, Massachusetts Institute of Technology
77 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA 02139 (USA)

2. Strukturen von IspH und IspG

2.1. Historischer Hintergrund, Aktivität und Bioinformatik

In einer frühen Arbeit zeigten Adam et al., dass IspH-Proteine drei hochkonservierte Cysteine enthalten (Abbildung 1a), die an der Bindung des Eisen-Schwefel-Clusters beteiligt sein könnten.^[12] Basierend auf der breiten Absorp-

tion um 420 nm bei gereinigtem IspH aus *A. aeolicus* schlugen auch Altincicek et al. das Vorhandensein eines Eisen-Schwefel-Clusters vor.^[13] Ob IspH einen $[Fe_4S_4]$ ^[14,15] oder $[Fe_3S_4]$ -Cluster^[16] enthält (näheres hierzu in Abschnitt 2.2), war zunächst unklar, bekannt war aber, dass ein Eisen-Schwefel-Cluster für die Katalyse entscheidend ist. Proteinrekonstitution^[14] oder Koexpression mit dem *isc*-Operon^[16] sowie anaerobe experimentelle Bedingungen führten zu einer signifikanten Erhöhung der IspH-Aktivität. Zudem wurden mehrere Reduktionssysteme untersucht, einschließlich der NAD(P)H/Flavodoxin/Flavodoxin-Reduktase (Ferredoxin),^[14–16] NADPH/Ferredoxin/Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase,^[17] Methylviologen/Dithionit^[13,17] sowie der Deazaflavin-katalysierten Photoreduktion.^[14–16] Unter Verwendung von Dithionit und künstlichen Elektronenmediatoren wurden später noch höhere Aktivitäten erreicht.^[18] Typische IspH-Aktivitäten sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

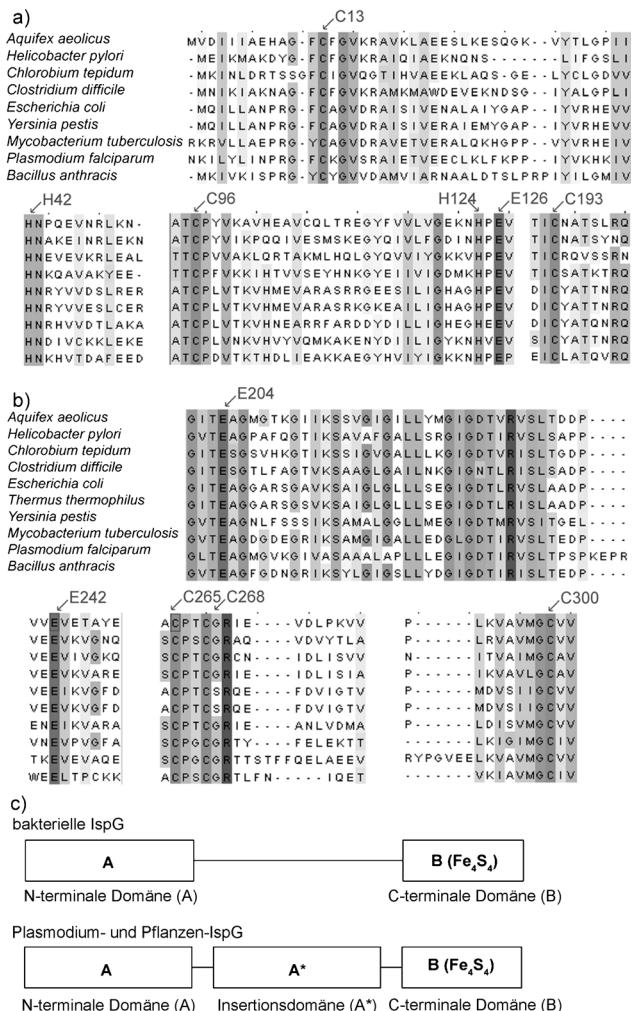


Abbildung 1. Bioinformatische Analyse von IspH und IspG. a) Sequenzvergleich für IspH. b) Sequenzvergleich für IspG. c) Schematische Darstellung der Organisation der IspG-Domänen.



Weixue Wang studierte Chemie an der Peking University und promovierte in Biophysik und Computerbiologie an der University of Illinois in Urbana-Champaign bei Eric Oldfield als American Heart Association Predoctoral Fellow. Zurzeit ist er Postdoktorand bei Stephen J. Lippard am Massachusetts Institute of Technology. Seine Forschungsinteressen gelten der Biosynthese, bioanorganischen Chemie und Spektroskopie.

Tabelle 1: In der neueren Literatur beschriebene Aktivitäten von IspH.

Quelle	Reduktionssystem	Spezifische Aktivität [$\mu\text{mol mg}^{-1}$ min^{-1}]	K_m [μM]	K_{cat} [s^{-1}]	Lit.
<i>E. coli</i>	Dithionit, Methylviologen, pH 8.0, 37°C	16.3	19.7	9.54	[18]
<i>E. coli</i>	Dithionit, 6,7-Dihydro-2,11-dimethylipyrido[1,2- <i>a</i> :1- <i>c</i>]pyrazinium-dibromid, pH 8.0, 37°C	30.4	31.6	17.6	[18]
<i>E. coli</i>	Dithionit, Methylviologen, pH 7.5	45 ± 3.6	n.d.	26.1 ± 2.1	[19]
<i>E. coli</i>	NADPH, Flavodoxin- Reduktase, Flavodoxin, pH 8.0, 37°C	0.8	1	0.46	[20]
<i>A. aeolicus</i>	Dithionit, Methylviologen, pH 8.0, Raumtemperatur	1.95	6.4	1.04	[21]



Eric Oldfield studierte Chemie an der Bristol University und promovierte in biophysikalischer Chemie an der Sheffield University bei Dennis Chapman. Danach arbeitete er als EMBO Fellow an der Indiana University mit Adam Allerhand und am MIT mit John Waugh. Er trat 1975 dem chemischen Institut der University of Illinois at Urbana-Champaign bei und ist heute Harriet A. Harlin Professor of Chemistry. Seine Forschungsinteressen gelten der Wirkstoffentwicklung und Spektroskopie.

IspG und IspH

Um andere funktionell wichtige Gruppen zu identifizieren, nutzten wir den JPRED3-Server^[22] zum Abgleich von 461 IspH-Sequenzen aus verschiedenen Organismen. Die Ergebnisse dienten als Input für den SCORECONS-Server,^[23] der einen „Konservierungsindex“ mit Werten von 1.000 (am höchsten konserviert) bis 0 (nicht konserviert) über alle Gruppen erstellte. In Tabelle 2 stehen die JPRED3/

Tabelle 2: Einige der streng konservierten Reste in IspH (*E.coli*-Nummerierung). Die Aktivitätswerte der IspH-Mutanten sind Lit. [19] entnommen.

Aminosäure	Konservierungsgrad	<i>E.coli</i> -Mutante	Aktivität
H124	0.984	H124N	<1.0%
E126	0.965	E126Q	<1.0%
S225	0.94	S225C	<1.0%
N227	0.938	N227Q	<4.4%

SCORECONS-Ergebnisse für einige der am höchsten konservierten Gruppen in IspH aus *Aquifex aeolicus*. Neben den drei für die $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clusterbindung benötigten Cys zeigten auch H124, E126, S221 und N223 (H124, E126, S225 und N227 im IspH von *E. coli*) sehr hohe Konservierungswerte, und diese Aminosäuren sind – basierend auf ortsspezifischen Mutagenese-Befunden – in der Tat essentiell für die IspH-Katalyse.^[19,24]

In einer sehr frühen Studie wurde für IspG ein Mechanismus vorgeschlagen, der dem der Vitamin K-Epoxychinon-Reduktase oder Ribonukleotid-Reduktase ähnelt.^[25] Danach wurde festgestellt, dass IspG ein Eisen-Schweifel-Enzym mit drei konservierten Cys ist, die mit einem $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster koordiniert sind.^[14,26] Wie bei IspH wurden auch für IspG mehrere Redoxsysteme zur Aktivitätsmessung genutzt, inklusive der NAD(P)H/Flavodoxin/Flavodoxin-Reduktase,^[26–28] Methylviologen/Dithionit,^[29–32] Photoreduktion durch Deazaflavin^[15,26,27] oder durch eine Thylakoidaufbereitung von Spinat-Chloroplasten für die pflanzliche (*A. thaliana*) IspG.^[28] IspG-Aktivitäten aus neueren Beiträgen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: In der neueren Literatur beschriebene Aktivitäten von IspG.

Quelle	Reduktions-system	Spezifische Aktivität [$\mu\text{mol mg}^{-1}$ min^{-1}]	K_m [μM]	K_{cat} [s^{-1}]	Lit.
<i>E. coli</i>	Dithionit, Methylviologen, pH 8.0, 37°C	0.55	311 ± 21	0.395	[29]
<i>A. aeolicus</i>	Dithionit, Methylviologen, pH 9.0	2.5 (60°C); 11.3 (90°C)	n.d.	1.6 (60°C); 7.4 (90°C)	[30]
<i>T. thermophilus</i>	Dithionit, Methylviologen, pH 8.0, Raumtemperatur	0.124	8	0.09	[31]

Es gibt zwei verschiedene Klassen von IspG-Enzymen. In den meisten Bakterien zeigt ein multipler Sequenzabgleich drei konservierte Cys (Abbildung 1b) sowie zwei Hauptdomänen (A und B, Abbildung 1c) mit zahlreichen konservierten Aminosäuren, und die SCORECONS-Analyse^[23] identifiziert in Übereinstimmung mit Mutagenese-Ergebnissen E204 (in *A. aeolicus*; 232 in *Thermus thermophilus*) als eine der am strengsten konservierten Aminosäuren.^[30,33]

In Pflanzen (z.B. *Arabidopsis thaliana*), Malariaparasiten (z.B. *Plasmodium falciparum*) sowie in mehreren anderen Bakterien (wie *Chlorobium tepidum* und *Chlamydia trachomatis*) liefert eine bioinformatische Analyse nicht nur zwei, sondern drei Domänen: A, A* und B (Abbildung 1c).^[33,34] Die A*-Domänen weisen etwa die gleiche Gesamtlänge auf wie die A-Domänen, doch gibt es tatsächlich keine konservierten Aminosäuren in den verschiedenen A*-Sequenzen. Dies deutet auf eine primär strukturelle, im Gegensatz zu einer direkteren katalytischen Funktion der A*-Domäne. Es stellt sich die Frage: Wie sehen die dreidimensionalen Strukturen von IspH und der 2-Domänen- und 3-Domänen-IspGs aus? Wo befinden sich die essentiellen Aminosäuren? Wie sind sie an der Katalyse beteiligt?

2.2. Röntgenuntersuchungen der IspH-Struktur

Die erste Röntgenkristallstruktur eines IspH-Proteins wurde von Rekittke et al. für das Protein aus *Aquifex aeolicus* (PDB-Code: 3DNF) beschrieben,^[35] gefolgt von der Struktur des *E.coli*-Proteins (PDB: 3F7T) durch Gräwert et al.^[19] In beiden Fällen wurde beobachtet, dass das Protein eine „Kleeblatt“-Struktur mit drei α/β -Domänen um einen zentralen $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Cluster herum annimmt (Abbildung 2a). Ba-

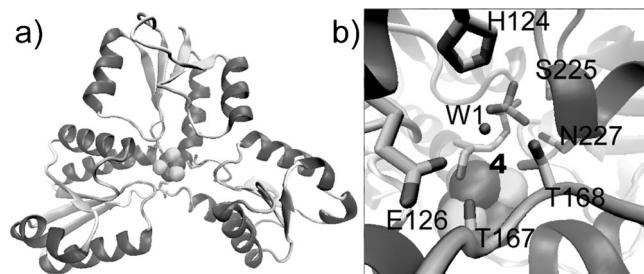


Abbildung 2: Röntgenkristallstrukturen von IspH. a) Ligandenfreies IspH aus *A. aeolicus*, die eine Kleeblatt-Faltung mit einem $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Cluster im Zentrum zeigt (PDB: 3DNF).^[35] b) IspH aus *E. coli* mit gebundener **4**; die Struktur zeigt, dass **4** einen Alkoxid-Komplex mit dem $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster bildet (PDB: 3KE8).^[36] Einige wichtige Aminosäuren im aktiven Zentrum sind dargestellt. Die Abbildung wurde mit VMD erstellt.^[38]

sierend auf früheren Untersuchungen mit EPR-Spektroskopie^[14] wurde angenommen, dass der kristallographisch beobachtete $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Cluster tatsächlich ein Artefakt ist, verursacht durch den Verlust eines Fe-Atoms aus dem $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster während der Kristallisation. Das $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{Cys})_3]$ -Koordinationsmotiv gleicht dem der Aconitase^[4] und lässt vermuten, dass Substrat **4** sich an das spezielle vierte Fe anlagern könnte

und die Elektronenübertragung/reduktive Dehydroxylierungsreaktionen erleichtert. In einer Docking-Studie wurde das vierte Fe „rekonstruiert“ und vorgeschlagen, dass sich Substrat **4** über O-1 an das vierte Fe bindet und einen Alkoxid-Komplex bildet.^[35] Tatsächlich erhielten Gräwert et al.^[36] in einer späteren Arbeit die Röntgenkristallstruktur von IspH mit [Fe₄S₄]-gebundenem **4** (PDB: 3KE8), die diesen Vorschlag stützt – ebenso wie die Ergebnisse der Mößbauer-Spektroskopie.^[37] Diese Ligand-gebundene Struktur zeigte eine geschlossenere Konformation, verglichen mit der ohne Ligand, wobei das streng konservierte E126 nahe beim [Fe₄S₄]-Cluster und der Hydroxygruppe von **4** positioniert ist. Der Wasserstoff der Diphosphatgruppe band an eine Reihe polarer Aminosäuren, einschließlich der hochkonservierten H124, S225 und N227 (H124, S221 und N223 in *A. aeolicus* IspH), wie in Abbildung 2b gezeigt.

2.3. Röntgen- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der IspG-Struktur

Zwei Jahre nach den ersten Berichten über IspH-Strukturen erhielten Lee et al. die Kristallstruktur von IspG aus *A. aeolicus* (PDB: 3NOY),^[30] einem Zwei-Domänen-IspG-Protein (AB), rasch gefolgt von einer Arbeit von Rekittke et al.^[39] zur Struktur von IspG aus *T. thermophilus* (PDB: 2Y0F), einem weiteren Zwei-Domänen-Protein. IspG aus *A. aeolicus* kristallisiert als Dimer, (AB)₂ (Abbildung 3a). Die A-Domäne (N-terminal) gehört zur TIM-Fass-Superfamilie

lie^[40] und zeigt starke strukturelle Ähnlichkeit zur Dihydropteroat-Synthase,^[41] während die B-Domäne (C-terminal) den [Fe₄S₄]-Cluster enthält und eine ähnliche Faltung wie die Sulfit-Reduktase^[42] und die Ferredoxin-Domänen der Nitrit-Reduktase aufweist.^[43] Ein Glutamat- (E350 in *T. thermophilus*; E307 in *A. aeolicus*) und drei Cysteine der B-Domäne koordinieren an den [Fe₄S₄]-Cluster. Die Abstände zwischen den mutmaßlichen aktiven Zentren in einem AB-Monomer sind sehr groß (ca. 40 Å), sodass beide Arbeitsgruppen vermuteten, dass nur Dimere aktiv sind, da sie eine Kopf-Schwanz-Struktur annehmen könnten (Abbildung 3a,b), in der die aktiven Zentren aus der A-Domäne eines Monomers und der B-Domäne des zweiten Monomers bestehen; eine „scharnierartige“ oder eine Öffnung/Schließ-Bewegung während der Katalyse würde den Substrat-Eintritt bzw. Produkt-Austritt ermöglichen. Dieser Vorschlag wurde kürzlich von Rekittke et al. durch Lösung einer 3-gebundenen IspG-Struktur (PDB: 4G9P, Abbildung 3b,c) bestätigt, in der die Diphosphatgruppe von **3** klar an die A-Domäne eines Moleküls im Dimer bindet, während die C-3-OH-Gruppe an das vierte Fe im [Fe₄S₄]-Cluster der B-Domäne des zweiten Moleküls im Dimer koordiniert (Abbildung 3c) und die Katalyse startet.^[44]

Bisher wurden keine Röntgenkristallstrukturen von 3-Domänen-IspG beschrieben. Nach Liu et al. deuteten aber die Ergebnisse aus sechs unterschiedlichen Strukturvorhersegeprogrammen darauf hin, dass die A*- oder „Zusatz“-Domäne in einigen 3-Domänen-IspGs ebenfalls die TIM-Fass-Faltung^[33] annehmen könnte, wie man sie in den A-Domänen fand. Die Ergebnisse ließen eine Drei-Domänen-Struktur A(TIM)-A*(TIM)-B(Fe₄S₄) vermuten (Abbildung 1c), worin sich alle konservierten Reste in den Domänen A und B befinden. Dieser Strukturvorschlag wurde durch Ergebnisse aus Einzelpartikel-Elektronenmikroskopiestudien gestützt, die erkennen lassen (Abbildung 3d), dass das Homologiemodell (für IspG aus *A. thaliana*) gut zu der mittels Elektronenmikroskopie beobachteten Elektronendichte passt.^[33] Daher wird angenommen, dass die katalytischen Mechanismen der 2- und 3-Domänen-IspGs gleich sind, mit dem einzigen Unterschied, dass das 3-Domänen-Protein eine zusätzliche A*-Domäne aufweist, die eine primär strukturelle Aufgabe hat.

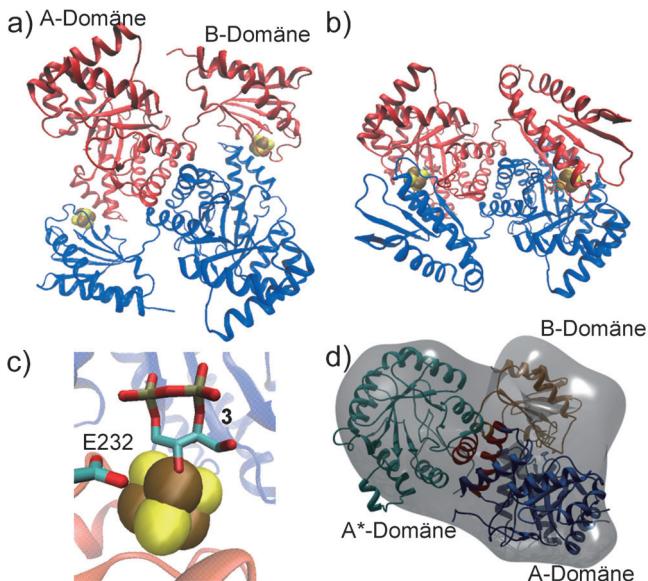


Abbildung 3. Strukturen von IspGs. a) Ligandenfreie IspG aus *T. thermophilus* (PDB: 2Y0F).^[39] b) IspG aus *T. thermophilus* mit gebundenem **3** (PDB: 4G9P).^[44] c) **3** bindet an den [Fe₄S₄]-Cluster, indem O3 einen Alkoxid-Komplex bildet; die streng konservierte Aminosäure E232 ist 3.7 Å von O3 entfernt.^[44] d) Ein Modell der Drei-Domänen-IspG aus *A. thaliana*, integriert in eine 20 Å Elektronendichtekarte, erstellt mittels Einzelpartikel-Elektronenmikroskopie der *A. thaliana*-IspG.^[33] Bilder (a–c) wurden mittels VMD erstellt.^[38] Bild (d) mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [33].

2.4. Untersuchung von Eisen-Schwefel-Clustern im aktiven Zentrum durch Mößbauer-Spektroskopie

Die elektronischen Strukturen und Ligandenkoordination des Eisen-Schwefel-Clusters in den aktiven Zentren von IspG und IspH wurden mittels ⁵⁷Fe-Mößbauer-Spektroskopie direkt untersucht. Seemann et al. beschrieben als erste eine Mößbauer-spektroskopische Studie von ⁵⁷Fe-rekonstituierten, oxidierten [Fe₄S₄]²⁺-IspGs aus *A. thaliana* (ein pflanzliches 3-Domänen-Protein, Abbildung 4a) und *E. coli* (ein 2-Domänen-Protein, Abbildung 4b).^[45] Darin zeigten die [Fe₄S₄]-Cluster der 2- und 3-Domänen-Proteine sehr ähnliche Mößbauer-Spektren. Insbesondere ergab sich ein 3:1-Signalintensitätsverhältnis, das vermutlich auf drei tetraedrisch mit Schwefel koordinierten Fe^{2.5+}-Zentren und ein Fe^{2.5}-Zentrum

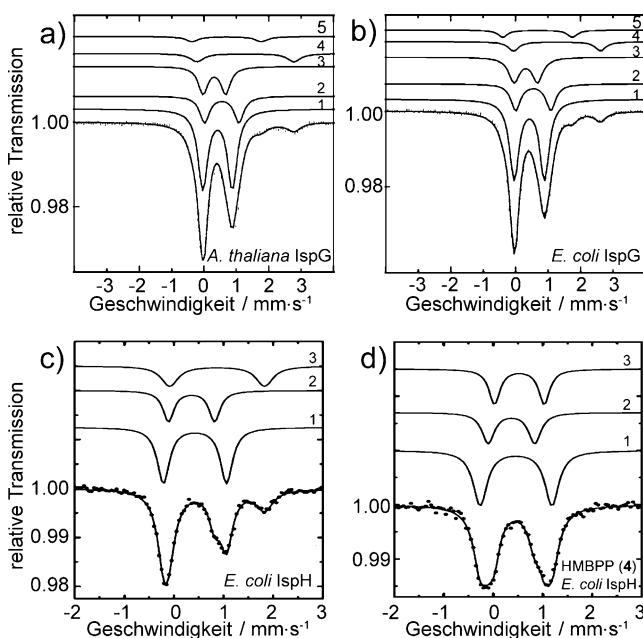


Abbildung 4. Mößbauer-Spektren von IspG und IspH. a) Mößbauer-Spektrum von $356 \mu\text{M}$ ^{57}Fe -rekonstituierter IspG aus *A. thaliana* bei $T = 77 \text{ K}$.^[45] b) Mößbauer-Spektrum von $413 \mu\text{M}$ ^{57}Fe -rekonstituierter IspG aus *E. coli* bei $T = 77 \text{ K}$.^[45] Abdruck in veränderter Form mit Genehmigung von Springer Science and Business Media aus Lit. [45]. c) Mößbauer-Spektrum von IspH aus *E. coli* bei $T = 77 \text{ K}$.^[37] d) Mößbauer-Spektrum von IspH aus *E. coli* mit gebundem 4 bei $T = 77 \text{ K}$.^[37] Abdruck in veränderter Form mit Genehmigung aus Lit. [37], Copyright (2009) American Chemical Society.

mit einem Nicht-Cystein-Liganden neben drei Schwefelligan- den zurückzuführen ist. Dieser Vorschlag stimmt mit späteren röntgenkristallographischen Beobachtungen^[44] überein, wonach der vierte Ligand in oxidiertem IspG ein Glutamat ist.

Bei IspH unterschieden sich die Mößbauer-Ergebnisse für das oxidierte Protein von den bei IspG beobachteten, indem dort nun drei Eisenzentren mit einem Intensitätsverhältnis von 2:1:1 auftraten (Abbildung 4c).^[18,37] Zentrum 1 war charakteristisch für tetraedrisch mit Schwefel koordinierte $\text{Fe}^{2.5+}$ -Zentren gemischt-valenter Eisenpaare mit einem de- lokalisierten Überschusselektron. Zentrum 2 war typisch für ein High-Spin-Eisen(III) und Zentrum 3 bezeichnend für ein High-Spin-Eisen(II). Durch Vergleich mit anderen $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Proteinen bekannter Koordinationsgeometrie wurde vermutet, dass oxidiertes IspH drei S- und drei N/O-Liganden ent- hält^[37] – obwohl die tatsächliche Beschaffenheit des N/O-Liganden noch zu bestimmen bleibt. Nach Bindung von Sub- strat 4 an das oxidierte Protein verringerte sich die Isome- renverschiebung der dritten Komponente (High-Spin- Fe^{2+}) von $\delta_3 = 0.89 \text{ mm s}^{-1}$ auf $\delta_3 = 0.53 \text{ mm s}^{-1}$, was in Einklang mit früher errechneten Vorhersagen zeigt, dass 4 an das beson- dere vierte Fe bindet, da sich die anderen spektralen Kom- ponenten nicht veränderten (Abbildung 4d).^[35] Dieselben Resultate wurden mit IspH überproduzierenden *E. coli*-Zellen erhalten, ein starker Beleg dafür, dass das aktive Zentrum in IspH (in Zellen) einen $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ - und keinen $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Cluster enthält.^[37]

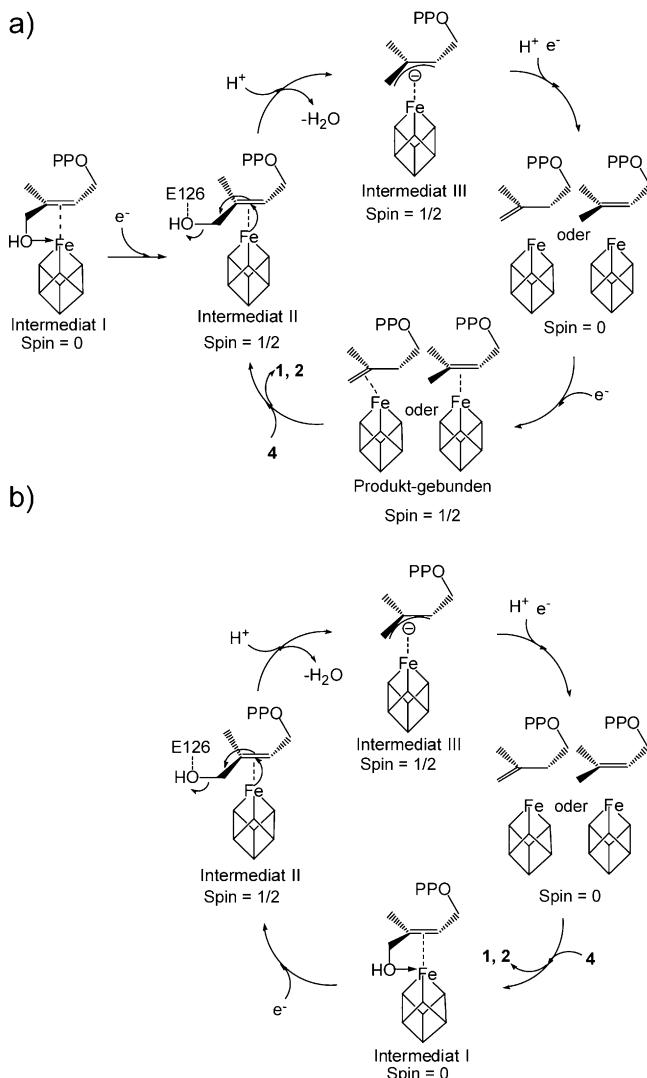
Diese bioinformatischen, röntgenkristallographischen und Mößbauer-spektroskopischen Untersuchungen führten zu ausführlichen, jedoch im Grunde „statischen“ Bildern der Isp- und IspG-Struktur. Um zu verstehen, wie diese zwei Enzyme die $2\text{H}^+/2\text{e}^-$ -Reduktionen katalysieren, müssen transiente Spezies (z.B. Reaktionszwischenstufen) erfasst und charakterisiert werden. Die paramagnetische Eigenschaft reduzierter $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster ausnutzend, spielte die EPR-Spektroskopie eine wichtige Rolle bei der Identifizierung einiger während der Katalyse abgefangener Reaktionszwischenstufen und führte in Kombination mit den Ergebnissen aus röntgenkristallographischen, stereochemischen und anderen experimentellen (und theoretischen) Studien zu detaillierten mechanistischen Vorschlägen sowohl für die IspH- als auch die IspG-Katalyse sowie anschließend zu deren Inhibierung.

3. Die katalytischen Mechanismen von IspH

Wie IspH die „reduktive Dehydroxylierung“ von HMBPP (4) katalysiert, blieb fast eine Dekade lang ungelöst, und es wurden sieben Mechanismen mit Carbokation-, Carbanion- oder Kohlenstoffradikal-Zwischenstufen vorgeschla- gen.^[13–15, 19, 46–49] Aktuelle spektroskopische Untersuchungen lieferten keine Beweise für eine radikalische Spezies^[50] und weisen auf einen „biometallorganischen“ Mechanismus mit direkten Eisen-Kohlenstoff-Wechselwirkungen während der Katalyse hin,^[24,50] wie in Schema 2 zusammengefasst. Drei vermutliche Zwischenstufen wurden abgefangen und cha- rakterisiert und führen zu Mechanismusvorschlägen, die auf EPR-spektroskopischen Studien und DFT-Rechnungen, Mößbauer-spektroskopischen, röntgenkristallographischen sowie stereochemischen Ergebnissen basieren.

3.1. IspH-Zwischenstufe I: die Alkoxid-Zwischenstufe

Um den katalytischen Zyklus zu starten, bindet Substrat 4 zunächst an den oxidierten Cluster ($[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$) von IspH, wodurch Intermediat I entsteht (Schema 2). Wie oben ange- sprochen, deuten Docking-Studien,^[35] Mößbauer-Spektro- skopie^[37, 51] sowie Röntgenkristallographie^[36] auf einen η^1 -Alkoxid- oder Alkoholatkomplex als Zwischenstufe hin. Diese Spezies kann (Schema 2a), muss aber nicht (Sche- ma 2b) an einer Steady-State-Katalyse beteiligt sein; in letz- terem Szenario kann IspH direkt nach der Bildung der Pro- dukte **1** oder **2** durch einen Überschuss an Reduktionsmittel reduziert werden. Substrat 4 verdrängt dann das Produkt und bindet direkt an den reduzierten $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ -Cluster unter Bil- dung von Zwischenstufe II und unter Umgehung von Zwi- schenstufe I. Diese Möglichkeit wird durch die Beobachtung untermauert, dass der Produkt-gebundene $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ -Cluster in der EPR-Untersuchung der Steady-State-Katalyse nachge- wiesen wurde, wenn Substrat 4 in Gegenwart eines Über- schusses an Reduktionsmittel verbraucht war (Abbildung 1 in Lit. [24]). Weitere Experimente werden benötigt, um das wahrscheinlichere Szenario zu ermitteln.



Schema 2. Der biometallorganische Mechanismus der IspH-Katalyse. OPP steht für die Diphosphatgruppe.

3.2. IspH-Zwischenstufe II: der schwache π -Komplex mit rotierter Hydroxymethylgruppe

Der ursprüngliche biometallorganische Mechanismus für die IspH-Katalyse,^[24] bei der IspH reduziert wird, sah vor, dass sich die Hydroxymethylgruppe von **4** im Zwischenprodukt I vom $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{+}$ -Cluster wegdreht, um mit E126, einer streng konservierten Aminosäure, die als Protonendonator fungieren soll,^[35] zu interagieren und Zwischenstufe II zu liefern. Dieser Vorschlag wird durch die Befunde aus drei Experimenten gestützt. Erstens wurde in der Kristallstruktur eines Wildtyp-IspH(*E. coli*):**4**-Komplexes nach Röntgenbestrahlung tatsächlich die Rotation der Hydroxymethylgruppe beobachtet.^[52] Der IspH:**4**-Komplex wurde vermutlich durch die vorhergehende Röntgenbestrahlung photoreduziert; die Hydroxymethylgruppe von **4** dissoziierte dann vom vierten Eisen ab und drehte sich vom Cluster weg, um eine Wasserstoffbrücke mit der Diphosphatgruppe von **4** und E126 einzugehen (Abbildung 5a). Zweitens wurde unter Verwendung einer E126Q- oder E126A-IspH-Mutante eine Zwischenstufe

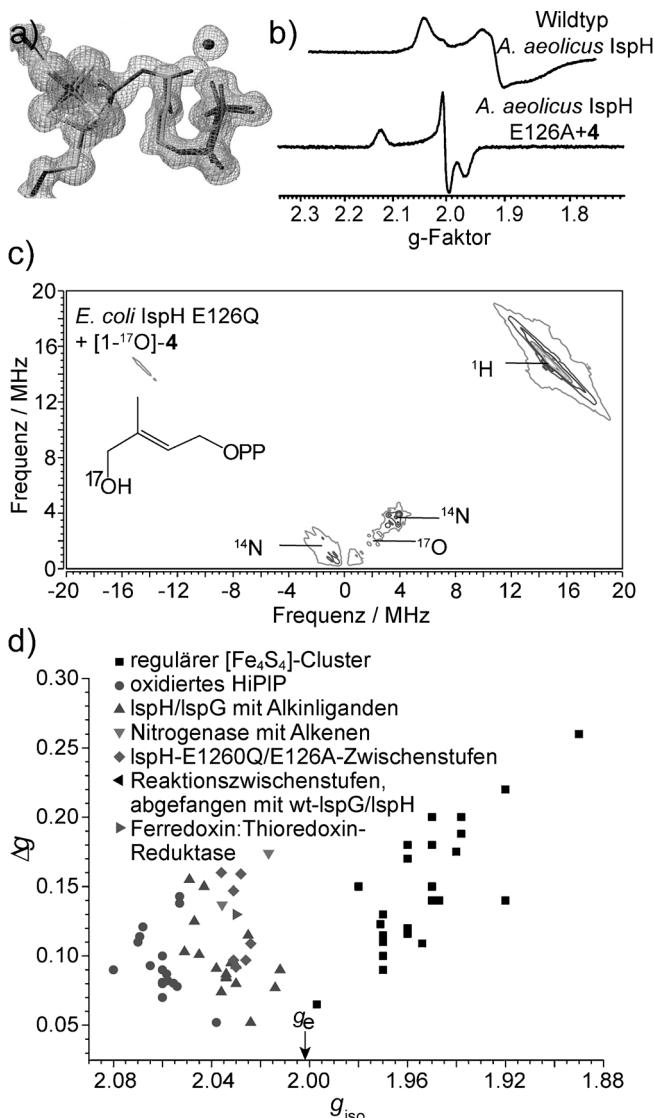


Abbildung 5. Zwischenstufe II der IspH-Katalyse. a) Die Zwischenstufe II mit gedrehter Hydroxymethylgruppe wurde zusammen mit dem Alkoxid-Komplex bei zuvor röntgenbestrahlten Kristallen beobachtet. Abdruck mit Genehmigung von Elsevier aus Lit. [52], Copyright (2011). b) Das EPR-Spektrum der ligandenfreien *A. aeolicus*-IspH (oben) und der Zwischenstufe II, abgefangen mit einer E126A-Mutante. Abdruck mit Genehmigung angepasst aus Lit. [24]. c) HYSCORE-Spektrum der Zwischenstufe II, abgefangen mit $[1-^{17}\text{O}]\text{-4}$. d) Auftragung von g_{iso} gegen Δg für 80 den Eisen-Schwefel-Cluster enthaltende Systeme. Abdruck mit Genehmigung aus Lit. [50], Copyright (2012) American Chemical Society.

abgefangen (Abbildung 5b).^[24,50] Das HYSCORE-Spektrum (hyperfine sublevel correlation; ein zweidimensional gepulstes EPR-Spektrum) dieser mit $[1-^{17}\text{O}]\text{-4}$ hergestellten Zwischenstufe zeigte lediglich eine ^{17}O -Hyperfeinwechselwirkung von ca. 1 MHz (Abbildung 5c).^[50] Diese ist viel kleiner als die ^{17}O -Hyperfeinwechselwirkungen, die in Systemen mit direkten Fe-O-Bindungen gefunden werden, wie z.B. der Aconitase, für die ^{17}O -Hyperfeinkopplungskonstanten im Bereich von 8–15 MHz charakteristisch sind.^[53,54] Die geringe ^{17}O -Hyperfeinkopplung bedeutet, dass die terminale Hydro-

xygruppe von **4** nicht an den reduzierten Cluster ($[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{+}$) bindet, was im Einklang steht mit der röntgenvorbestrahlten Kristallstruktur des IspH:**4**-Komplexes. Das dritte, diese kritische Rotation untermauernde Experiment beschrieben Dickschat et al.,^[55] die durch ^2H -Isotopenmarkierung nachwiesen, dass das beobachtete *E/Z*- ^2H -Markierungsmuster in Produkt **1** das Entfernen der Hydroxymethylgruppe vom Cluster durch Rotation erfordert. Die Rotation ist aus mechanistischer Sichtweise kritisch, da dieser Schritt in radikalischen^[48] und Ferraoxetan^[21]-Modellen (siehe unten) für die IspH-Katalyse fehlt. Gewiss wird weitere Arbeit benötigt, um die kinetischen Parameter dieser Zwischenstufe in der von der Wildtyp-IspH katalysierten Reaktion zu bestimmen, jedoch lassen Ergebnisse aus Docking-, EPR- und Röntgen-Studien klar erkennen, dass diese kritische Rotation erfolgt, und zudem ist E126 eine geeigneter Protonenquelle verglichen mit T167, wie im Birch-Reduktions-Mechanismus vorgeschlagen.^[48,49]

Eine frühe EPR-Studie^[24] weist daraufhin, dass die Zwischenstufe II ein π -Komplex und kein freies Radikal ist. Die *g*-Tensoren der abgefangenen Zwischenstufe II (Abbildung 5b, $g=[2.124, 1.999, 1.958]$)^[24] ähneln denen, die bei einer Allylalkohol-gebundenen Nitrogenase- α -70^{Ala}-Mutante beobachtet wurden ($g=[2.123, 1.998, 1.986]$),^[56] weshalb für Alkensubstrat **4** ein ähnlicher „ σ/π -Komplex“ in Betracht gezogen wird, wie für den an die Nitrogenase- α -70^{Ala}-Mutante gebundenen Allylalkohol beschrieben wurde.^[56,57] Tatsächlich kann man beim Vergleich mit *g*-Tensoren von 80 anderen den $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster enthaltenden Proteinen und Modellkomplexen (Abbildung 5d) erkennen, dass der *g*-Tensor der Zwischenstufe II den Werten von Systemen mit Alken- oder Alkinliganden ähnelt und durch $g_{\text{iso}} > g_e$ (*g*-Wert eines freien Elektrons) gekennzeichnet ist.^[50] Aufgrund seines hoch anisotropen *g*-Tensors scheint es unwahrscheinlich, dass die Zwischenstufe II aus einem freien Radikal entsteht. Ebenso beweisen Ergebnisse einer Elektron-Kern-Doppelresonanz(ENDOR)-Studie, die für die beiden Fe-Paare im $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster ^{57}Fe -Hyperfeinkopplungskonstanten von 26 und 39 MHz, aber sehr kleine (ca. 1 MHz) ^{13}C -Hyperfeinkopplungskonstanten von $[\text{U}-^{13}\text{C}_5]-\mathbf{4}$ ergaben,^[24] dass die höchste Spindichte am $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster lokalisiert ist.

Zusammen deuten die oben beschriebenen Befunde darauf hin, dass die Zwischenstufe II ein π -Komplex mit einer vom reduzierten Cluster ($[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{+}$) abgewandten Hydroxymethylgruppe ist. Beachtet man, dass die in der Kristallstruktur beobachteten Fe-C-Abstände (2.8–3.3 Å)^[52] größer sind als die in klassischen metallorganischen π -Komplexen/Metallacylen, und weiterhin, dass die C2-C3-Kohlenstoffe nicht pyramidalisiert sind (wie im Zeise-Salz^[58]), so wird Zwischenstufe II wohl am besten als schwacher π - oder Van-der-Waals-Komplex formuliert, der **4** am aktiven Zentrum für die nächsten Reaktionsschritte „vorbereitet“.

3.3. IspH-Zwischenstufe III: der η^3 -Allyl-Komplex

Die terminale Hydroxygruppe von **4** in der Zwischenstufe II interagiert mit dem Protonendonator E126. Im nächsten katalytischen Schritt wird diese Hydroxygruppe protoniert

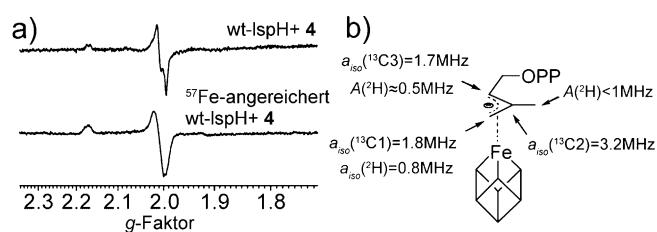


Abbildung 6. Zwischenstufe III der IspH-Katalyse. a) X-Band-EPR-Spektrum der Zwischenstufe III, abgefangen mit Wildtyp-IspH aus *E. coli* mit natürlicher Häufigkeit und ^{57}Fe -angereichert. Abdruck in veränderter Form mit Genehmigung aus Lit. [50], Copyright (2012) American Chemical Society. b) Hyperfeinkopplungskonstanten von Ligandenatomen in Zwischenstufe III. $a_{\text{iso}}(^2\text{H})$ für das Deuterium an C1 wurde in Lit. [21], andere in Lit. [50, 59] bestimmt.

und als Wassermolekül abgespalten unter Bildung von Zwischenstufe III. Diese Zwischenstufe wurde durch Zusatz von **4** zu Ein-Elektron-reduzierter IspH abgefangen,^[21,59] sowie durch rasches „Einfrieren“ der Reaktion einer Wildtyp-IspH mit **4** unter Steady-State-Bedingungen (Abbildung 6a),^[50] und ist durch einen anisotropen *g*-Tensor gekennzeichnet (z.B. $g=[2.173, 2.013, 1.997]$) für die Zwischenstufe, abgefangen mit IspH aus *A. aeolicus* oder *P. falciparum*).^[21] Detalliertere Pre-Steady-State-Kinetikstudien sind erwünscht, um die kinetische Kompetenz dieser Zwischenstufe zu bestätigen,^[60] allerdings stimmt die unter Steady-State-Bedingungen beobachtete Kinetik mit der Kinetik des Enzyms in Gegenwart von Methylviologen überein. Diese Zwischenstufe verschwind innerhalb von 5 s, wenn 120 Äquiv. Dithionit, 1 Äquiv. Methylviologen und 50 Äquiv. **4** eingesetzt wurden,^[50] in Übereinstimmung mit der spezifischen Aktivität von $16.3 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ^[18] und dem k_{cat} -Wert von 9.8 s^{-1} (Tabelle 1). Ohne Methylviologen, mit Dithionit als einzigem Reduktionsmittel, läuft die Reaktion um drei Größenordnungen langsamer ab, und diese Spezies kann – abhängig von der zugesetzten Substrat- und Lösungsmittelmenge – längere Zeit beobachtet werden.

Die terminale Hydroxygruppe ist in dieser Spezies nicht vorhanden, nachgewiesen durch das Fehlen einer ^{17}O -Hyperfeinwechselwirkung im HYSCORE-Spektrum von Proben, die mit $[1-^{17}\text{O}]-\mathbf{4}$ hergestellt wurden.^[50,59] Die aus EPR-Daten ermittelte Spindichtevertteilung macht es unwahrscheinlich, dass Zwischenstufe III als freies Allylradikal vorliegt. Zudem verbreiterte sich das Continuous-Wave-EPR-Spektrum beim Einsatz von ^{57}Fe -angereicherter IspH signifikant (Abbildung 6a), was darauf hinweist, dass sich die höchste Spindichte am $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster befindet. Dies ist im Einklang mit den für Zwischenstufe III beobachteten kleinen ^{13}C - und ^2H -Hyperfeinkopplungskonstanten, wie in Abbildung 6b zusammengefasst:^[21,50,59] Die ^2H - und ^{13}C -Hyperfeinkopplungskonstanten sind mehr als siebenfach (^2H) bzw. fünfzehnfach (^{13}C) kleiner als die für ein Allylradikal erwarteten Werte.^[61]

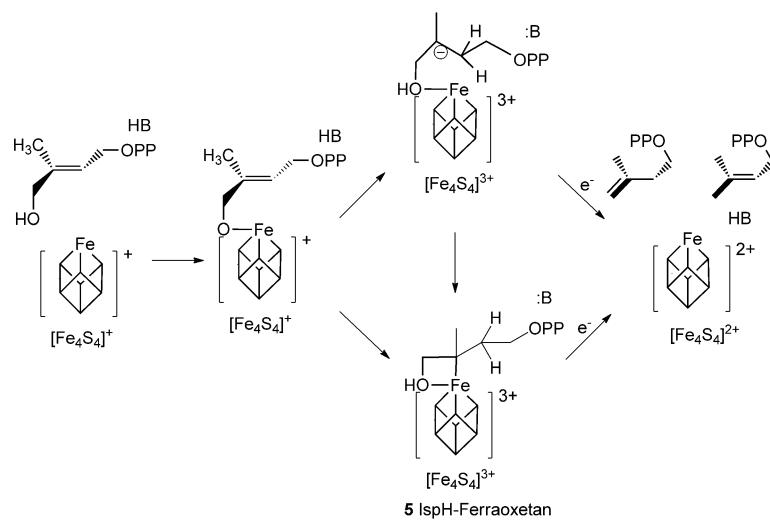
Die Beschaffenheit der Zwischenstufe III zeigt sich des Weiteren durch ihren *g*-Tensor, der durch $g_{\text{iso}} > g_e$ charakterisiert wird. Für einen $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{+}$ -Cluster ist dies ungewöhnlich und erinnert an ein oxidiertes High-Potential-Eisen-Schweif-Protein (HiPIP, $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$).^[62] Um die mechanistischen

Auswirkungen dieses ungewöhnlichen *g*-Tensors zu verstehen, ist es von Interesse, den katalytischen Mechanismus der Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase (FTR), einem gut erforschten $[Fe_4S_4]$ -Enzym, das die $2H^+/2e^-$ -Reduktion einer Disulfid-Bindung katalysiert, zu untersuchen.^[63–65] Wie IspH erzeugt FTR ein Intermediat mit $g_{iso} > g_e$ ($g = [2.11, 2.00, 1.98]$),^[64] bedingt durch eine Zwei-Elektronen-Reduktion der Disulfid-Bindung durch den reduzierten Eisen-Schwefel-Cluster $[Fe_4S_4]^{+}$ unter Bildung eines HiPIP-ähnlichen $[Fe_4S_4]^{3+}$ -Clusters und unter Vermeidung eines freien Thiol-Radikals.^[64,65] Mit Kenntnis dieser Reaktion lässt der HiPIP-ähnliche *g*-Tensor der Zwischenstufe III bei der IspH-Katalyse auf eine Zwei-Elektronen-Reduktion von **4** durch den reduzierten Eisen-Schwefel-Cluster ($[Fe_4S_4]^{+}$) schließen und führt zu einem Allylanion, das an den HiPIP-ähnlichen $[Fe_4S_4]^{3+}$ -Cluster η^3 -komplexiert ist. Es ist jedoch auch möglich, dass ein Protonentransfer zum Allylanion unter Bildung eines an den HiPIP-Cluster komplexierten Produkts (**1** oder **2**) als Zwischenstufe III erfolgt ist.

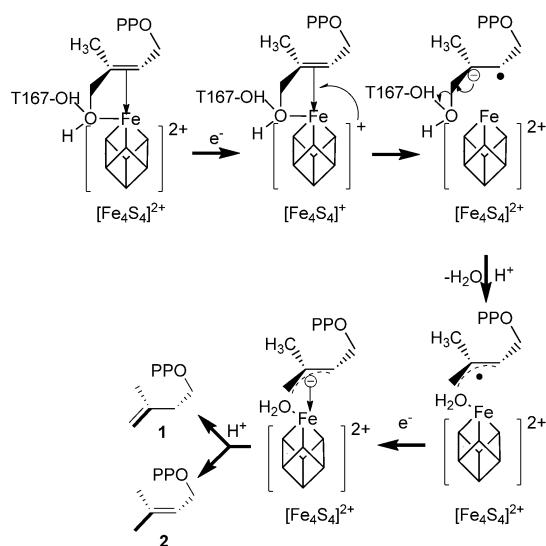
3.4. Andere mechanistische Möglichkeiten für IspH

Weitere vorgeschlagene Mechanismen lassen sich in zwei Typen unterteilen: 1) Mechanismen mit radikalischen Zwischenstufen, vertreten durch den Birch-Reduktionsmechanismus (Schema 3),^[48,49] und 2) Mechanismen mit anderen biometallorganischen Spezies (Schema 4).^[21]

Beim Birch-Reduktionsmechanismus gibt es zwei Schwierigkeiten. Erstens fehlt in diesem Mechanismus die



Schema 4. Der Ferraoxetan-Mechanismus der IspH-Katalyse.^[21] Abdruck in veränderter Form mit Genehmigung aus Lit. [21, 50], Copyright (2012) American Chemical Society.

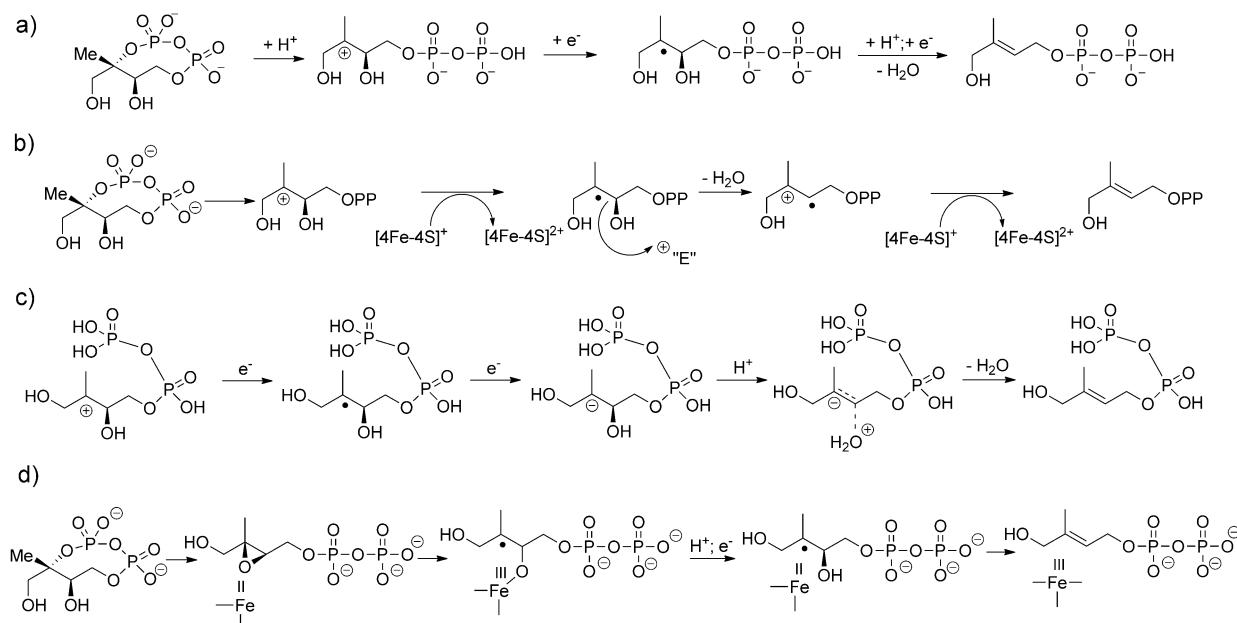


Schema 3. Der vorgeschlagene Birch-Reduktionsmechanismus der IspH-Katalyse.^[48,49] OPP steht für die Diphosphatgruppe. Abdruck in veränderter Form mit Genehmigung aus Lit. [50], Copyright (2012) American Chemical Society.

Rotation der Hydroxymethylgruppe von **4**, die aufgrund von Docking-Studien,^[35] EPR-Spektroskopie^[50] und Röntgenkristallographie^[52] vermutet und durch Isotopenmarkierungsversuche^[55] bestätigt wurde. Stattdessen wird vorgeschlagen, dass die terminale Hydroxygruppe von **4** durch T167, einen viel schwächeren Protonendonator als E126, protoniert und entfernt wird. Zweitens wurden die vermuteten Radikalspezies in keinem Experiment beobachtet, und die beobachteten Spezies waren keine freien Radikale. Stattdessen fanden wir in quantenchemischen Berechnungen heraus,^[59] dass ein $[Fe_4S_4]^{2+}$ /Radikal-Cluster weniger stabil ist als ein $[Fe_4S_4]^{3+}$ /Allylanion, was bedeutet, dass während der Geometrieoptimierung ein interner Elektronentransfer stattfindet.

Um die Beschaffenheit der Reaktionszwischenstufe mit $g_1 = 2.17$ (Zwischenstufe III in unserem Mechanismus) zu erklären, wurde ein anderes Modell mit einem Ferraoxetan (**5**, Schema 4) vorgeschlagen.^[21] Diese Struktur ähnelt der von uns früher für die Zwischenstufe X in der IspG-Katalyse (siehe unten) vorgeschlagenen,^[31,33,66,67] allerdings stimmt die Beteiligung von Ferraoxetan **5** in der IspH-Reaktion mit mehreren experimentellen Beobachtungen nicht überein; vor allem das Fehlen einer ^{17}O -Hyperfeinwechselwirkung in Proben, die mit $[1-^{17}\text{O}]\text{-}4$ hergestellt wurden,^[50] schließt die Möglichkeit einer Fe-O-Bindung aus. Zudem gibt es keinen Beweis für eine direkte bindende Wechselwirkung zwischen dem apikalen Fe und C2: die ^{13}C -Hyperfeinkopplungskonstanten für C1, C2 und C3 sind alle klein (1.8–3.2 MHz; Abbildung 6b) und können in DFT-Rechnungen an einem η^3 -Allyl-Modellkomplex reproduziert werden,^[59] während die Fe-C2- ^{13}C -Hyperfeinkopplung im Ferraoxetan 17 MHz beträgt.^[67] Weitere Schwierigkeiten in diesem Modell sind die Abwesenheit der kritischen Rotation der Hydroxymethylgruppe, die fehlende logische Erklärung für die Bildung von Produkt **2** oder die Reaktion mit einem Fluor-Substratanalogen, das keine Fe-F-Bindung eingeht.^[50,68]

IspG und IspH

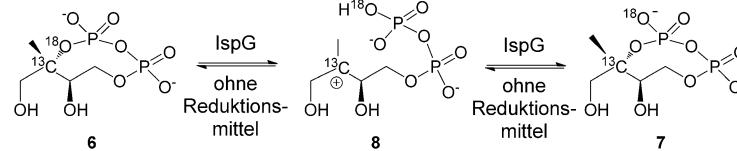


Schema 5. Vorgeschlagene Reaktionsmechanismen für die IspG-Katalyse. a) Kation → Radikal-Mechanismus von Kollas et al.^[32] b) Kation → Radikal → Kationradikal-Mechanismus von Seemann et al.^[26] c) Kation → Radikal → Anion-Mechanismus von Brandt et al.^[69] d) Oxiran → Radikal-Mechanismus von Rohdich et al.^[15]

4. Die katalytischen Mechanismen für IspG

In frühen Arbeiten wurden einige Mechanismen mit Carbokationen, Carbanionen, einem Epoxid und Kohlenstoffradikal-Reaktionszwischenstufen vorgeschlagen (Schema 5).^[15,26,32,69] Die ersten drei Mechanismen in Schema 5 verwenden alle ein Carbokation als erste Reaktionszwischenstufe. Die Bedeutung einer solchen Zwischenstufe wurde später durch Isotopenaustauschexperimente mit dem [$2^{13}C, 18O$]-markierten Substrat MEcPP belegt (6, Schema 6).^[70] Basierend auf den unterschiedlichen chemi-

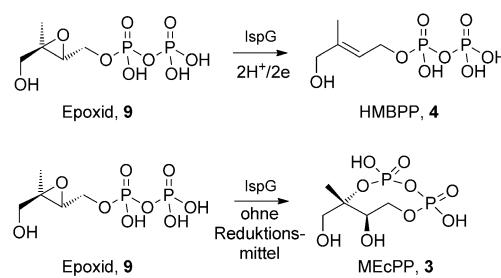
Katalyse initiiert (Schema 5d). Dieser Vorschlag basierte auf früheren Beobachtungen, wonach ein Epoxid durch einen künstlichen $[Fe_4S_4]$ -Cluster^[71] zu einem Ethylen reduziert werden konnte, und wird von der Tatsache untermauert, dass Epoxid 9 tatsächlich ein IspG-Substrat darstellt (Schema 7) mit einem k_{cat} (20.1 min^{-1}), der mit dem des natürlichen Substrats 3 (23.7 min^{-1} , Tabelle 3) vergleichbar ist.^[72] Weiterhin bilden 9 und 3 bei Reaktion mit IspG das gleiche paramagnetische Zwischenprodukt (Zwischenstufe X, siehe unten), das durch EPR- und ^1H -ENDOR-Spektroskopie identifiziert wurde.^[66] Diese Befunde beweisen jedoch nicht das Vorkommen von 9 in der reduktiven Dehydroxylierung von 3 durch IspG. Bemühungen, die Bildung von 9 aus 3 unter oxidierenden oder reduzierenden Bedingungen nachzuweisen, blieben erfolglos, während die umgekehrte Reaktion, die von oxidiertem IspG katalysierte Umwandlung von 9 in 3 ($k_{cat} 2.0 \text{ min}^{-1}$), beobachtet wurde.^[73] Daher ist es wahrscheinlich, dass 9 normalerweise nicht an der Katalyse beteiligt ist. Vielmehr können sowohl 9 als



Schema 6. Isotopenaustausch von 6 (isotopenmarkiertes 3) katalysiert durch oxidierte IspG.

schen Verschiebungen von C2 nach Bindung an ^{16}O oder ^{18}O wurde gezeigt, dass nach Zugabe von IspG und in Abwesenheit eines Reduktionsmittels 6 in 7 umgewandelt werden kann, was auf die Öffnung des Cyclodiphosphat-Rings und die transiente Bildung der carbokationischen Spezies 8 hinweist (Schema 6). Die beobachtete Geschwindigkeit der Umwandlung war jedoch 63-mal niedriger als k_{cat} von IspG bei der Katalyse der reduktiven Dehydroxylierung von 3, möglicherweise wegen der eingeschränkten Rotation der Diphosphonatgruppe in 8.^[70]

Rohdich et al.^[15] schlugen einen alternativen Mechanismus vor, worin die Bildung einer Epoxid-Zwischenstufe die



Schema 7. Reaktionen von Epoxid 9 mit IspG.

auch **3** die gleiche Reaktionszwischenstufe X bilden, die dann in **4** umgewandelt wird.

Die nächste Zwischenstufe in den vorgeschlagenen Mechanismen (Schema 5) ist ein freies Kohlenstoff-Radikal, aber wie bei IspH wurden bisher noch keine Radikalspezies beschrieben. Allerdings wurde mittels EPR eine paramagnetische Spezies mit $g = [2.087, 2.019, 2.000]$ (Zwischenstufe X, Abbildung 7a) in der eingefrorenen Reaktion von IspG mit **3**^[74] oder **9** beobachtet.^[66] Es ist unwahrscheinlich, dass es sich um ein freies Radikal handelt, obwohl sich das EPR-Spektrum nach Einfang durch ^{57}Fe -angereicherte IspG signifikant verbreitert (Abbildung 7a), was auf eine hohe Spindichte am $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster deutet. Überzeugendere Be-

weise für die Natur der Zwischenstufe X stammen aus ausführlichen Hyperfeinkopplungs-Tensormessungen, die nahelegen, dass „X“ ein Ferraoxetan ist, eine metallorganische Spezies mit Fe-C- und Fe-O-Bindungen, wie im Folgenden beschrieben wird. Aber warum ein Ferraoxetan? Solch eine Spezies scheint äußerst gespannt zu sein, was für eine Reaktionszwischenstufe jedoch nicht unbedingt von Nachteil ist. Zudem würde die Öffnung des Cyclodiphosphat-Rings eine mögliche Bindungsstelle (C2) am speziellen vierten Eisen des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{+}$ -Clusters zur Bildung einer Fe-C-Bindung führen.

Ein Hinweis auf eine Fe-C-Bindung kommt von ^{13}C -Hyperfeinkopplungsmessungen an Zwischenstufe X. Im HYSCORE-Spektrum von X, das durch $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ -markiertes **3** abgefangen wurde, konnte eine große ^{13}C -Hyperfeinkopplung mit einem Hyperfeinkopplungstensor von $A(^{13}\text{C}) = [14.5, 12.0, 26.5]$ MHz beobachtet werden (Abbildung 7b).^[67] Die isotrope Hyperfeinkopplungskonstante $a_{\text{iso}}(^{13}\text{C})$ von 17.7 MHz ist signifikant höher als die für den Nitrogenase:Allylalkohol-Komplex beobachteten Werte von 3.7 und 1.1 MHz, wo der Allylalkohol vermutlich direkt an den FeMo-Cofaktor bindet und mit einem der Fe-Zentren einen Metallacyclus bildet.^[56] Sie ist vergleichbar mit dem $a_{\text{iso}}(^{13}\text{C})$ -Wert von 17.1 MHz für ^{13}CO in durch CO inhibierter $[\text{FeFe}]$ -Hydrogenase, wo CO direkt an den H_{ox} -Cluster bindet.^[75] Der stark gebundene Kohlenstoff in X wurde mittels $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ - und $[1,3,4-^{13}\text{C}_3]$ -markiertem **3** als C2 (quartärer Kohlenstoff) bestimmt; der benachbarte Kohlenstoff (C3) weist eine viel kleinere Hyperfeinkopplungskonstante $a_{\text{iso}}(^{13}\text{C}) = 3.0$ MHz auf, und alle anderen Kohlenstoffe haben $a_{\text{iso}}(^{13}\text{C}) < 1$ MHz.^[66,67]

Evidenz für eine Fe-O-Bindung liefern ^{17}O -HYSCORE-Studien von X, das unter Verwendung spezifisch ^{17}O -markierter Substrate gebildet wurde. Da sich ^{17}O -markiertes **9** viel einfacher chemisch synthetisieren lässt als ^{17}O -markiertes **3** und beide die gleiche Zwischenstufe X bilden, wurden $[1-^{17}\text{O}]$ - und $[2,3-^{17}\text{O}]$ -markiertes **9** genutzt, um „X“ zu synthetisieren. Bei $[1-^{17}\text{O}]$ -markiertem **9** wurde für die Zwischenstufe X nur eine sehr kleine ^{17}O -Hyperfeinkopplung (0.15 MHz, durch Simulation, Abbildung 7c) beobachtet, während die aus $[2,3-^{17}\text{O}]$ -**9** hergestellte Zwischenstufe X eine große ^{17}O -Hyperfeinkopplung (8 MHz, Abbildung 7d) aufwies. Die Hyperfeinkopplungskonstante von 8 MHz ist vergleichbar mit denen, die beobachtet wurden, wenn H_x^{17}O ($A(^{17}\text{O}) = 8-12$ MHz)^[53] oder ^{17}O -markierte Substrate oder Substratanaloga ($A(^{17}\text{O}) = 9-15$ MHz)^[54] an das besondere Eisenatom (Fe_a) von Aconitase gebunden waren. Die ^{17}O -HYSCORE-Ergebnisse deuten daher darauf hin, dass die 3-OH-Gruppe, nicht die 1-OH-Gruppe, von **3** direkt an das besondere vierte Eisenatom des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clusters in X bindet. Diese Schlussfolgerung wird belegt durch die Kristallstruktur einer mit **3** komplexierten IspG^[44] (Abbildung 3c), in der eine Fe-O3-Bindung existiert (im oxidierten Zustand des Eisen-Schwefel-Clusters).

Die Daten aus ^{13}C - und ^{17}O -Hyperfeinkopplungsmessungen weisen auf eine Bindung von C2 und O3 zum $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster in der Zwischenstufe X hin, was die Anzahl an denkbaren Strukturen für diese Spezies einschränkt. Am wahrscheinlichsten erscheint Ferraoxetan **10** (Schema 8). **10** mag ungewöhnlich erscheinen, doch sind einige Metalla-

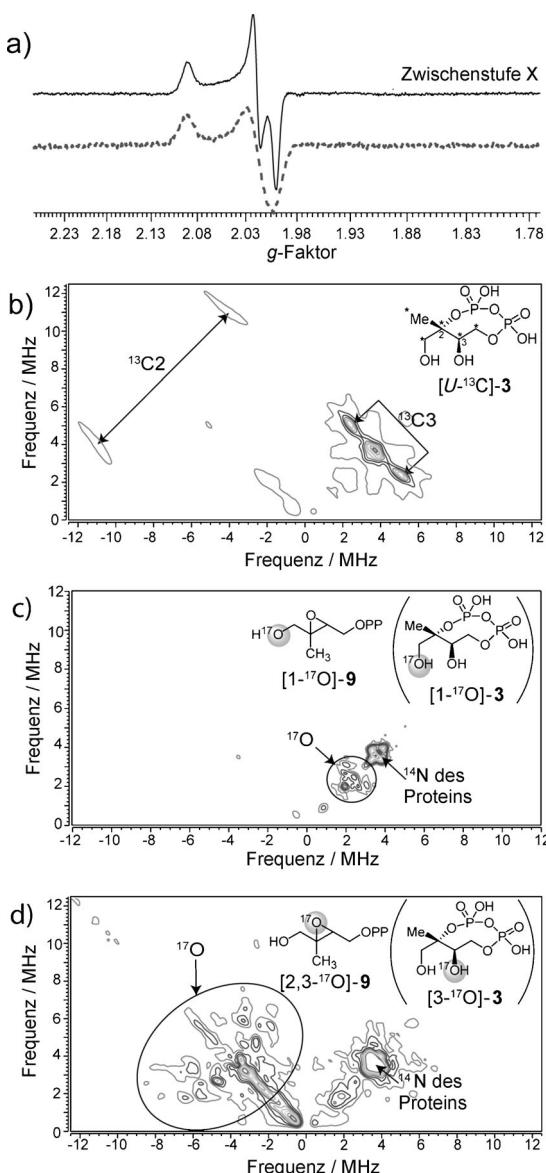
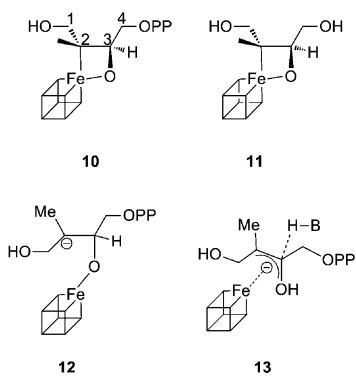


Abbildung 7. EPR-spektroskopische Charakterisierung der Zwischenstufe X von IspG aus *E. coli*. a) Continuous-Wave-EPR der Zwischenstufe X. Die gestrichelte Linie gehört zur Zwischenstufe, die mit ^{57}Fe -angereicherter IspG abgefangen wurde. b-d) HYSCORE-Spektrum von Zwischenstufe X mit b) $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ -**3**, c) $[1-^{17}\text{O}]$ -**9** und d) $[2,3-^{17}\text{O}]$ -**9**. Abdruck in veränderter Form mit Genehmigung aus Lit. [33, 66, 67].



Schema 8. Vorgeschlagene Strukturen für die Zwischenstufe X (**10**, **12**, **13**) und ein für DFT-Rechnungen verwendetes Modell-Ferraoxetan (**11**). OPP steht für die Diphosphatgruppe.

tane als stabile Spezies bekannt.^[76,77] Zudem wurde im Fall einer Interaktion von Eisen mit Oxiran mittels Matrixisolation das 1,2-Ferraoxetan beobachtet,^[78] und beim Erwärmen geht das Ferraoxetan eine [2+2]-Dissoziation zu Ethen und FeO ein.^[78]

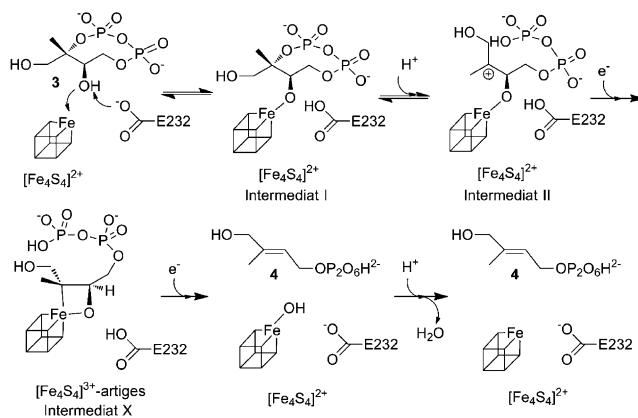
Die Ergebnisse der ³¹P- und ¹H-ENDOR-Spektroskopie sind ebenfalls im Einklang mit Ferraoxetan **10** als der Zwischenstufe X. Der ³¹P-Hyperfeinkopplungstensor wurde entweder als ein isotropisch dominierter Tensor ($A = [0.21, 0.09, 0.05]$ MHz) oder ein dipolar dominierter Tensor ($A = [0.22, -0.11, -0.09]$ MHz) bestimmt.^[31] In jedem Fall weisen die sehr geringen Hyperfeinkopplungen darauf hin, dass die Diphosphatgruppe nicht an den Eisen-Schwefel-Cluster bindet. Basierend auf dem dipolar dominierten Tensor wurde mit einem Punkt-Dipol-Modell ein Mindestabstand von 6.6 Å zwischen Phosphorkern und besonderem vierten Eisenatom abgeschätzt.^[31] Die ¹H-Hyperfein-Kopplungskonstanten aller von **3** stammenden Protonen wurden durch ENDOR-Spektroskopie und selektive ²H-Isotopenmarkierung ermittelt.^[67] Die größte ¹H-Hyperfeinkopplung ($A(^1\text{H}) = [14, 11, 11]$ MHz)^[31] in der Zwischenstufe X wurde einem Proton der C2'-Methylgruppe zugeschrieben; alle anderen Protonen, inklusive der beiden anderen Protonen der C2'-Methylgruppe haben viel kleinere Hyperfeinkopplungen.^[67] Die geringe Anisotropie des Hyperfeintensors mit $A(^1\text{H}) = [14, 11, 11]$ MHz ist im Einklang damit, dass dieses Proton in der zweiten Koordinationssphäre des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clusters vorliegt und eine schwache dipolare Wechselwirkung mit dem paramagnetischen Zentrum besteht. Der große Unterschied in den Hyperfeinkopplungskonstanten für die drei Protonen der C2'-Methylgruppe wurde ebenso durch DFT-Rechnungen an einem Modell-Ferraoxetan **11** (siehe unten)^[33] reproduziert, was diese strukturelle Zuordnung weiter bestätigt.

DFT-Rechnungen am Modell-Ferraoxetan $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SMe})_3(-\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})(\text{CH}_3)\text{-CH}(\text{CH}_2\text{OH})-\text{O}-)^{2-}$ (**11**, Schema 8)^[33] ergaben einen vernünftigen Satz an Vorhersagen für die experimentell gemessenen Hyperfeinkopplungskonstanten. Besonders die großen Unterschiede in den Hyperfeinkopplungskonstanten der drei Protonen der C2'-Methylgruppe wurden nachvollzogen, sie folgen aus der Abhän-

gigkeit der Hyperfeinkopplungskonstanten von den H-C-C-Fe-Diederwinkel. Die berechnete große Kopplung ($A(^1\text{H}) = 9.1$ MHz) stand in vernünftigem Verhältnis zum experimentellen Ergebnis (12 MHz) und war dem *trans*-Proton (Fe-C-C-H-Drehwinkel 172°) zuzuordnen, während die kleineren Hyperfeinkopplungen von den *gauche*-(+/-)-Protonen mit geometrisch optimierten Torsionswinkel von 52, -67° herrührten.^[33] Ähnliche Abhängigkeiten der Hyperfeinkopplungskonstanten von Diederwinkel wurden bei Cβ-Protonen von Cystein-Liganden an $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -Clustern beobachtet;^[79] sie ähneln den beobachteten großen skalaren 3J -*trans*-Kopplungen in der NMR-Spektroskopie.

Für die Zwischenstufe X wurden zwei weitere Strukturen vorgeschlagen (Schema 8):^[31] die Carbanionen **12** und **13**. Struktur **12** ist unwahrscheinlich, da ein Carbanion nicht stabil wäre (da CH-Gruppen pK_a-Werte von ungefähr 40 haben) und, wichtiger noch, diese Struktur nicht mit den für C2 beobachteten hohen Hyperfeinkopplungskonstanten vereinbar wäre. Struktur **13** ist ebenso unwahrscheinlich: Das Ergebnis der Protonierung von O ist kein Oxaallyl (das stabil sein könnte), und ²H-3 wird während der Isoprenoid-Biosynthese nicht ausgetauscht.^[80]

Mit den Ergebnissen aus Isotopenaustausch,^[70] Röntgenkristallographie^[30,39,44] und ortsspezifischer Mutagenese^[30,33] schlagen wir den in Schema 9 gezeigten IspG-Mechanismus



Schema 9. Vorgeschlagener Mechanismus für die IspG-Katalyse, basierend auf Ergebnissen aus EPR-Spektroskopie, DFT-Rechnungen, Röntgenkristallographie, Mutagenese- und Isotopenaustauschexperimenten.

vor. Der erste Schritt ist die Koordination von O₃ (um den Sauerstoff als Wassermolekül zu entfernen) an das besondere vierte Eisenatom des oxidierten Eisen-Schwefel-Clusters ($[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$) zur Bildung des Alkoxid/Alkoholat-Komplexes, der in der Kristallstruktur von mit **3** cokristallisierter IspG beobachtet wurde.^[44] Diese Reaktion wird wahrscheinlich von E232 katalysiert – der laut SCORECONS-Analyse^[23] und der engen Nachbarschaft zum O₃ in der IspG:3-Kristallstruktur am höchsten konservierten Nicht-Cys-Aminosäure in IspG.^[44] Die Öffnung des Cyclodiphosphat-Rings und die Bildung des Carbokations sind reversibel, wenn **3** an den oxidierten Eisen-Schwefel-Cluster bindet, wie durch den

Austausch von ^{18}O in $[2\text{-}^{13}\text{C}, {^{18}\text{O}}]\text{-3}$ in Anwesenheit von oxidiertem IspG bewiesen wurde.^[70] Sobald ein Elektron vom Reduktionsmittel akzeptiert wurde, bildet sich ein Ferraoxetan (Zwischenstufe X). In Anbetracht des HiPIP-ähnlichen g -Tensors mit $g_{\text{iso}} = 2.035$ scheint es wahrscheinlich, dass der Ein-Elektronen-reduzierte Eisen-Schwefel-Cluster ($[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$) eine Zwei-Elektronen-Reduktion von **3** zur Bildung des Ferraoxetans durchführt, ähnlich der für FTR und nun für die IspH-Katalyse vorgeschlagenen. Das Ferraoxetan dissoziiert dann zum endgültigen Produkt **4** und oxidiert IspG durch die Aufnahme eines weiteren Elektrons und Protons.

5. IspH- und IspG-Inhibitoren

Ein wichtiger Forschungsaspekt bei der Isoprenoid-Synthese, einschließlich des MEP-Weges, ist die Entwicklung von Leitstrukturen für Antiinfektiva.^[10, 81–83] In den letzten drei Jahren ergaben sich deutliche Fortschritte bei der Entwicklung von IspH- und IspG-Inhibitoren, die teilweise von den Studien zum katalytischen Mechanismus profitierten – die ersten wirksamen IspH- und IspG-Inhibitoren, Alkindiphosphonate, wurden auf der Basis der vorgeschlagenen biomimetischen Katalysemechanismen von IspH entworfen. Bis jetzt wurden drei Strategien zur Entwicklung von IspH- und IspG-Inhibitoren eingesetzt: 1) Herstellung von Substratanaloga; 2) Mechanismus-basiertes, rationales Design und 3) Screening von Substanzbibliotheken. Diese Strategien werden in den folgenden Abschnitten zusammengefasst.

5.1. Substratanaloga als Inhibitoren

Substratanaloge, die an IspG oder IspH binden, aber nicht umgesetzt werden, könnten wirksame Inhibitoren sein und damit als neue Leitsstrukturen für Antiinfektiva oder Herbizide dienen. Der Ersatz der Diphosphatgruppe durch Carbamate (**14**), *N*-Acyl-*N'*-oxysulfamate (**15**) oder Aminosulfonylcarbamate (**16**) (Schema 10) führte nur zu schwachen inhibitorischen Effekten bei IspH oder IspG.^[84] Durch Substitution der Diphosphatgruppe verloren diese Verbindungen auch die Fähigkeit, humane V γ V δ 2-T-Zellen zu aktivieren, wobei **4** ein Aktivator mit 30 pm ist.^[85, 86]

Dagegen führte die Substitution der terminalen Hydroxygruppe durch ein Thiol (**17**) oder eine Aminogruppe (**18**) (Schema 10) zu wirksamen Inhibitoren mit IC₅₀-Werten von 0.21 μM bzw. 0.15 μM bei IspH.^[20, 51] Beide Inhibitoren wurden

nicht durch IspH umgesetzt (im Gegensatz zu Fluor-Analoga)^[49, 50] und binden reversibel mit der terminalen Thiol- oder Aminogruppe koordinierend an das besondere vierte Eisenatom unter Bildung von Komplexen, die dem Alkoxidkomplex ähneln, die mit dem natürlichen Substrat **4** beobachtet wurden. **18** erwies sich als langsam bindender Inhibitor, möglicherweise wegen des Deprotonierungsschrittes, der für die Bindung an den $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster notwendig ist.^[20] Solche Bindungsmodi wurden mittels Mößbauer-Spektroskopie (Abbildung 8a,b) und DFT-Rechnungen^[51] etabliert und später durch Röntgenkristallographie bestätigt (Abbildung 8c, PDB: 4H4E; und Abbildung 8d, PDB: 4H4D).^[68] Bei **18** wurde eine weitere Konformation beobachtet, in der

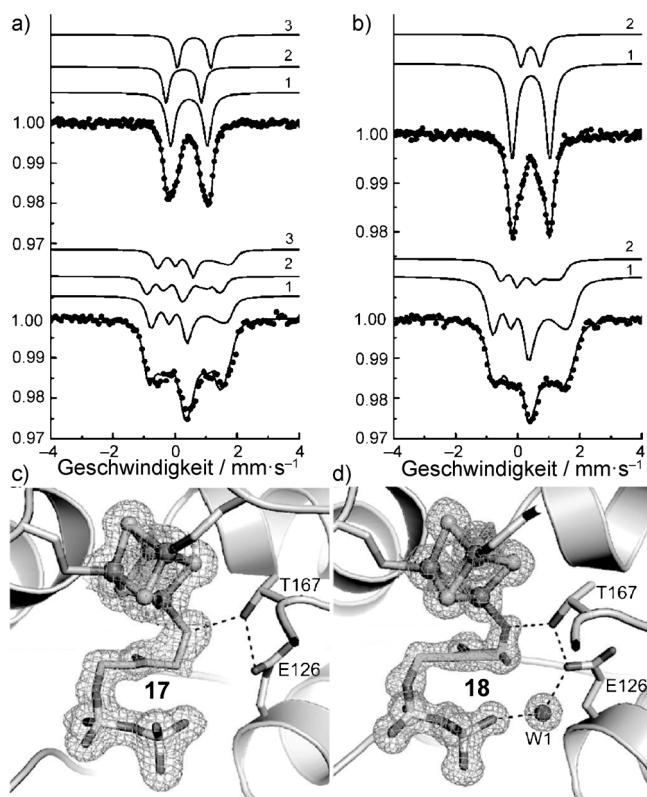
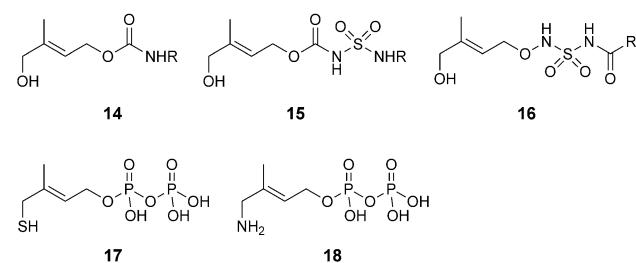


Abbildung 8. Bindung der Inhibitoren **17** und **18** an aus *E. coli*-IspH. a, b) Mößbauer-Spektren und Simulationen von **17** (a) und **18** (b) im Komplex mit IspH, aufgenommen bei $T = 77 \text{ K}$, $B = 0 \text{ T}$ (obere Spuren) und $T = 5 \text{ K}$, $B = 5 \text{ T}$ senkrecht zum γ -Strahl (untere Spuren). Abdruck in veränderter Form mit Genehmigung aus Lit. [51], Copyright (2013) American Chemical Society. c, d) Kristallstrukturen von **17** bzw. **18** im Komplex mit IspH. Abdruck in veränderter Form aus Lit. [68].

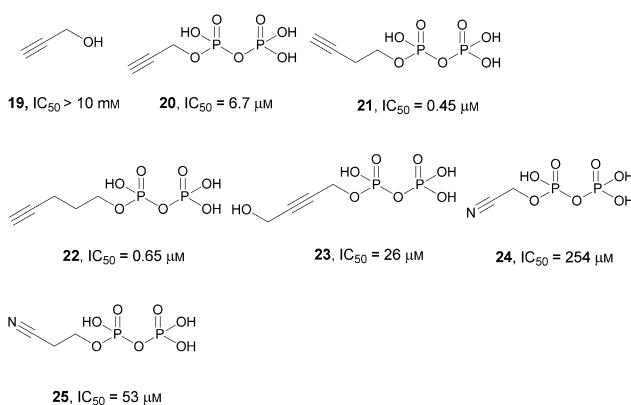


Schema 10. Substratanaloga als IspH-Inhibitoren.

sich die Aminomethylgruppe vom $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster wegdreht, vielleicht wegen der Photoreduktion des Eisen-Schwefel-Clusters im Röntgenstrahl.^[68] Gegenwärtig ist unklar, ob die Inhibition der Enzymkatalyse durch Bindung der Inhibitoren an den oxidierten Cluster, den reduzierten Cluster oder an beide erfolgt.

5.2. Der IspH-Katalysemechanismus als Basis für rationales Inhibitor-Design

Der biometallorganische Mechanismus der IspH-Katalyse führte zum rationalen Design wirksamer Inhibitoren, die sowohl auf IspH als auch IspG zielen. Der „rationale“ Aspekt ist die Annahme, dass bei IspH π -Komplexe mit Olefinen und Allyl anionen gebildet werden, wobei erwartet werden könnte, dass auch andere Spezies – Acetylene – an den $[Fe_4S_4]$ -Cluster binden würden. Es gibt tatsächlich mehrere Beispiele für die Bildung einer metallorganischen Spezies zwischen künstlichen $[Fe_4S_4]$ -Clustern und Alkinen. So schlugen McMillan et al.^[87] die Bildung einer metallorganischen Spezies mit seitlicher Acetylen-Einheit vor, um die *cis*-Reduktion von Acetylen zu Ethylen durch den reduzierten Cluster $[Fe_4S_4(SPh)_4]^{3-}$ zu erklären.^[87] Ein direkterer Beleg für die Bildung von π -Komplexen liefern die signifikanten Verschiebungen im Raman-Schwingungsspektrum von Acetylenen, wenn es an einen reduzierten $[Fe_4S_4]$ -Cluster gebunden ist.^[88] Daher wurde die Bindung und Hemmung von IspH (und IspG) durch Propargylalkohol (**19**) sowie einige Alkinediphosphate (**20–23**) und deren isoelektronische Analoga (**24** und **25**) untersucht (Schema 11). Wie erwartet, bindet



Schema 11. Untersuchte Alkin- und Cyanodiphosphat-Inhibitoren.^[89]

19 an reduzierte IspH, was EPR-Daten belegen, die große g-Wert-Änderungen anzeigen (Abbildung 9a), obwohl **19** nur eine schwache inhibitorische Wirkung auf IspH ausübt. Diese wird durch Zugabe einer Diphosphatgruppe zum resultierenden Propargyldiphosphat (**20**) auf einen IC₅₀ von 6.7 μ M gegen IspH aus *A. aeolicus* gesteigert.^[24] Wie **19** verändert **20** das EPR-Spektrum von IspH (Abbildung 9b), und bei Verwendung von $[U-^{13}C_3]-\mathbf{19}$ oder $[U-^{13}C_3]-\mathbf{20}$ wurde im ENDOR-Spektrum ein $A(^{13}C)$ von 6 MHz beobachtet (Abbildung 9c). Bei **20** wurde lediglich eine sehr geringe ³¹P-Hyperfeinkopplungskonstante (0.3 MHz) aufgezeichnet, was darauf hinweist, dass die Diphosphatgruppe nicht an den $[Fe_4S_4]^{+}$ -Cluster bindet (Abbildung 9d). Der bisher beste acetylenische Inhibitor ist **21** mit einem IC₅₀-Wert von 0.45 μ M ($K_i = 60$ nm) gegenüber IspH aus *A. aeolicus*.^[89] Die isoelektronischen Cyanodiphosphate **24** und **25** haben beide viel schwächere inhibitorische Wirkung, verglichen mit ihren Alkinediphosphat-Gegenstücken.

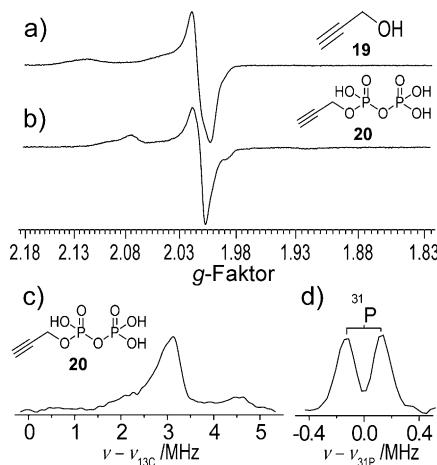
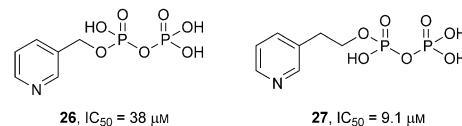


Abbildung 9. Bindung von Propargylalkohol oder Propargyldiphosphat an reduzierte *A. aeolicus*-IspH. a, b) X-Band-EPR-Spektren von **19** oder **20** im Komplex mit *A. aeolicus*-IspH. c, d) X-Band-¹³C- und ³¹P-ENDOR-Spektren von **20** im Komplex mit *A. aeolicus*-IspH. Abdruck in veränderter Form mit Genehmigung aus Lit. [24].

Die Alkindiphosphate erweisen sich ebenso als wirksame Inhibitoren von IspG. Beispielsweise ist **20** ein kompetitiver IspG-Inhibitor mit einem IC₅₀-Wert von 0.75 μ M ($K_i = 330$ nm).^[33, 66] Das EPR-Spektrum von IspG-gebundenem **20** gleicht dem von **20** gebunden an IspH, und das ENDOR-Spektrum zeigt eine signifikante Hyperfeinwechselwirkung von $A(^{13}C) = 7$ MHz, wenn $[U-^{13}C_3]-\mathbf{20}$ zu reduzierter IspG gegeben wird, was in Einklang steht mit der Bildung eines π -Komplexes.^[66]

5.3. Screening von Substanzbibliotheken

Eine dritte Klasse von IspH-Inhibitoren, Pyridindiphosphate (**26** und **27**, Schema 12), wurde durch Screening einer



Schema 12. Pyridindiphosphat-Inhibitoren gegen IspH aus *A. aeolicus*.^[89]

Bibliothek von Diphosphaten und Bisphosphonaten, die als Prenylsynthase-Inhibitoren entwickelt wurden, entdeckt.^[89] Diese Substanzen binden über den Stickstoff des Pyridinrestes direkt an den $[Fe_4S_4]^{+}$ -Cluster von IspH aus *A. aeolicus*, was durch die Veränderung im EPR-Spektrum nach Zugabe des Liganden (Abbildung 10a) und, wichtiger noch, durch die hohe ¹⁴N-Hyperfeinkopplung in den HYSCORE-Spektren von IspH im Komplex mit **26** oder **27** (Abbildung 10b) bewiesen wurde.^[90] Der ¹⁴N-Hyperfeinkopplungstensor des Pyridin-Stickstoffs von $A = [6.2, 7.6, 8.4]$ MHz und die Kernquadrupol-Kopplungskonstante mit $e^2 q Q/h = 3.0$ MHz sind beide vergleichbar mit Werten aus anderen Systemen, die

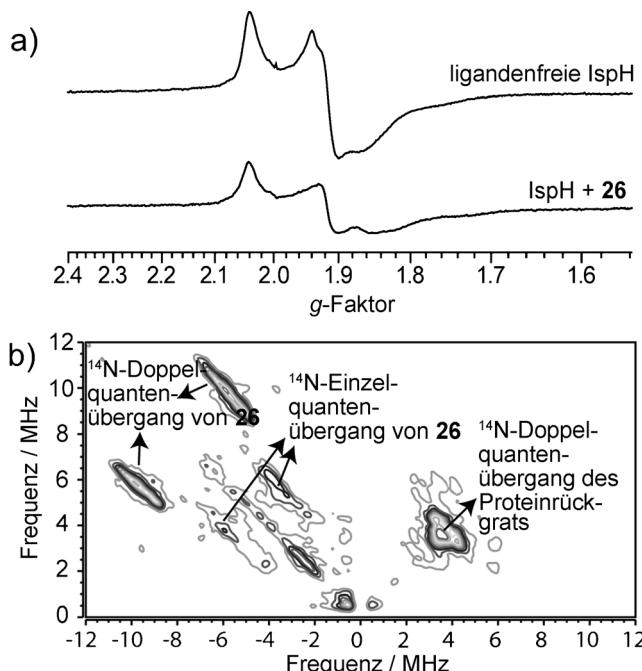


Abbildung 10. X-Band-EPR- und HYSCORE-Spektren von reduzierter IspH mit Pyridin-Inhibitor **26**. a) EPR-Spektren von ligandenfreier *A. aeolicus*-IspH (oben) und *A. aeolicus*-IspH + **26** (unten). b) HYSCORE-Spektrum von rekonstituierter *A. aeolicus*-IspH + **26**. Abdruck in veränderter Form mit Genehmigung aus Lit. [90], Copyright (2011) American Chemical Society.

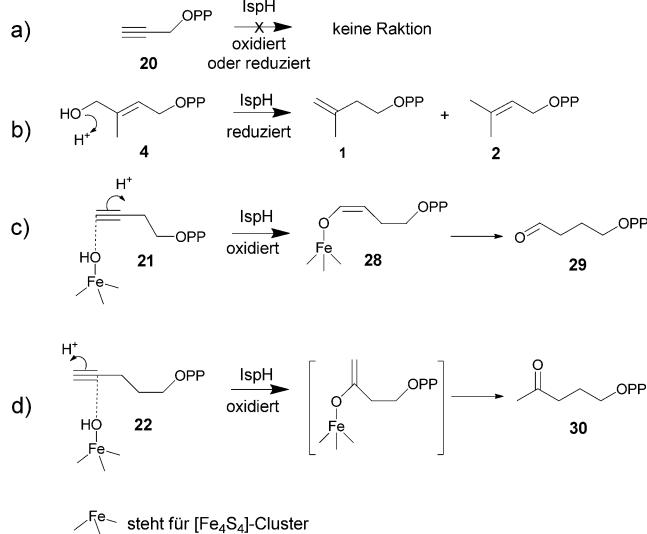
bekannte Fe-N-Bindungen enthalten.^[90] Allerdings waren diese Pyridindiphosphate nur schwache Inhibitoren für IspH aus *E. coli* ($IC_{50} = 0.5 \text{ mM}$ für **26**).

6. IspH ist auch eine Alkin-Hydratase

Um mehr darüber zu erfahren, wie diese acetylenischen Inhibitoren an IspH binden, wurden Röntgenkristall-Strukturbestimmungen von **20–22** im Komplex mit oxidiertem IspH als Vorversuch zur Strukturaufklärung der Bindung an reduzierten IspH durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass **20–22** an oxidierte IspH völlig anders binden im Vergleich zum vorgeschlagenen Bindungsmodus für das reduzierte Enzym. Zudem wurde eine unerwartete Hydratase-Aktivität von IspH entdeckt, die oxidiertes IspH **21** in einen Aldehyd und **22** in ein Keton umwandelt (Schema 13).^[91]

Die Röntgenkristallstruktur von **20** im Komplex mit oxidiertem IspH (Abbildung 11a, PDB: 3URK) zeigt, dass die acetylenischen Kohlenstoffatome von **20** 3.4 und 3.6 Å vom besonderen vierten Eisen entfernt sind. Zusätzlich bindet ein Wassermolekül (oder ein Hydroxid-Ion) über eine Fe-O-Bindung der Länge von 2.1 Å an den $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -Cluster; dies ist im wesentlichen derselbe Fe-O-Abstand, der bei der Bindung von **4** an oxidierte IspH beobachtet wurde.^[35,36]

Die Röntgenkristallstrukturen von IspH im Komplex mit **21** oder **22** waren noch erstaunlicher, denn sie zeigten, dass beide Liganden eine Hydratisierungsreaktion eingegangen waren. Die Kristallstruktur von IspH im Komplex mit **21**



Schema 13. Zusammenfassung von IspH-Reaktionen.

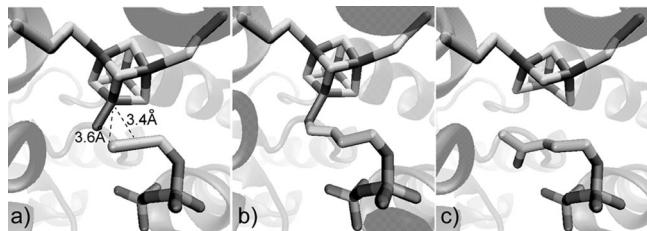


Abbildung 11. Röntgenkristallstrukturen von Alkindiphosphat oder den umgewandelten Produkten im Komplex mit *E. coli*-IspH. a) **20** + *E. coli*-IspH. (b) **21** nach Umsetzung zum Enolat **28** + *E. coli*-IspH. c) **22** nach Umsetzung zum Keton **30** + *E. coli*-IspH. Die Abbildungen wurden mittels VMD erstellt.^[38]

zeigte die Bildung des η^1 -Enolatkomplexes **28** durch Anti-Markownikow-Addition, und wieder wurde eine Fe-O-Bindungslänge von 2.0 Å gemessen (Abbildung 11b, PDB: 3UTC). Dieser Komplex wird umgesetzt, und Aldehyd **29** wurde detektiert.^[91] Im Fall von **22** enthüllte die Kristallstruktur wieder eine chemische Reaktion der Alkingruppe (Abbildung 11c, PDB: 3UTD), aber anstelle eines Aldehyds wiesen die Röntgendiffraktionsdaten auf eine Markownikow-Addition und Bildung des Ketons **30**.^[91]

Die von IspH katalysierten Reaktionen sind in Schema 13 zusammengefasst. Alle Substrate enthalten eine Diphosphatgruppe, die an die konservierte Diphosphat-Bindungsstelle bindet,^[19,47] und das C4 der Liganden ist nahe am besonderen vierten Eisen des oxidierten Clusters ($[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$) positioniert. Daraus folgt, dass bei **20** die C₃-Seitenkette so kurz ist, dass sie mit dem besonderen vierten Eisen reagieren kann (Schema 13a). Bei der C₄-Spezies **21** bindet dagegen die OH-Gruppe (vermutlich von einem clustergebundenen Wasser, wie in der Struktur von IspH:**20** gesehen) über Anti-Markownikow-Addition an C4, um das η^1 -Enolat **28** zu bilden, das dann als Aldehyd **29** freigesetzt wird (Schema 13c). Mit einer C₅-Seitenkette (**22**) bindet OH wieder an C4, aber nun muss

die Protonierung an C5 erfolgen (Markownikow-Addition) und liefert Keton **30** (Schema 13 d).

Die Hydratation/Dehydratisations-Reaktion ist eine der bekannten Reaktionen, die durch $[Fe_4S_4]$ -Cluster in mehreren Proteinen (wie Aconitase) katalysiert wird.^[5] Im Fall der Fumarase A (FumA) aus *E. coli* ist das Enzym auch in der Lage, die Hydratation eines Acetylens, Alcetylendicarboxylat,^[5,92,93] zu Oxaloacetat zu katalysieren. In der Wolfram-[Fe_4S_4]-enthaltenden Acetylen-Hydratase aus *Pelobacter acetylenicus* nimmt das $[Fe_4S_4]$ indirekt an der Katalyse teil, indem es den pK_a -Wert eines Asp im aktiven Zentrum erhöht.^[94,95] Die Elektronentransfer-Funktion von $[Fe_4S_4]$ kann auch eine Dehydratisationsreaktion erleichtern, wie bei der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *Clostridium symbiosum*, die ihr Substrat über eine Ketylradikal-Zwischenstufe dehydratisiert, demonstriert wurde.^[96] Angesichts dieser Beispiele ist die Hydratase-Aktivität von IspH keine Überraschung – obwohl in der Natur als $2H^+/2e^-$ -Deoxyge-nase optimiert, kann IspH, wenn ein passender Ligand an der richtigen Position lokalisiert ist, auch Hydratase-Aktivität aufweisen, eine der intrinsischen Aktivitäten von $[Fe_4S_4]$ -Clustern.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Die Strukturen und Wirkmechanismen der den $[Fe_4S_4]$ -Cluster enthaltenden Enzyme IspG und IspH waren viele Jahre lang von beträchtlichem Interesse, denn sie liefern die C₅-Bausteine IPP (**1**) und DMAPP (**2**) für eine der größten Klassen kleiner organischer Moleküle: die Terpene. Das Verständnis ihrer Strukturen, Wirkmechanismen und Inhi-bierung könnte zu neuen Medikamenten und Herbiziden führen. IspG und IspH katalysieren beide $2H^+/2e^-$ -Reduk-tionen, höchstwahrscheinlich über biometallorganische Re-aktionszwischenstufen. Für die IspG-Katalyse schlagen wir die Beteiligung einer Ferraoxetan-Zwischenstufe mit Fe-C- und Fe-O-Bindungen vor; in der IspH-Katalyse sind ein schwacher π -Komplex und ein Allyl- η^3 -Komplex eingebun-den. Die vorgeschlagenen Mechanismen sind die ersten Bei-spiele für biometallorganische Katalysemechanismen von $[Fe_4S_4]$ -Enzymen, die dann zur Entwicklung der ersten po-tenten Inhibitoren für IspH und IspG führten, den Alkindi-phosphaten. Weitere Inhibitoren wurden durch das Screening von Substanzbibliotheken und durch die Herstellung von Substratanaloga gefunden. Diese neuartigen Inhibitoren er-öffnen mögliche neue Wege zu antiinfektiösen Medikamen-ten, die an $[Fe_4S_4]$ -haltigen Proteinen des MEP-Weges der Isoprenoid-Biosynthese angreifen.

Es bleiben jedoch noch viele unbeantwortete Fragen. Wichtige Fragen zur Struktur sind: Wie sind die exakten Strukturen der Drei-Domänen-IspGs? Welche Liganden werden in oxidiertem IspH in Abwesenheit eines exogenen Liganden an den Cluster gebunden? Kann man Kristall-strukturen der Zwischenstufen erhalten? Aus funktioneller Perspektive müssen noch einige wichtige Aspekte angespro-chnen werden. Erstens, obwohl mit Dithionit und künstlichen Elektronenmediatoren eine hohe Aktivität erzielt wurde,^[18] bleibt das native Redoxsystem schwer zu fassen. Wie

brauchbar sind diese Modell-Redoxsysteme hinsichtlich der tatsächlichen Situation in Zellen? Zweitens besteht Bedarf an ausführlicheren kinetischen Pre-Steady-State-Studien der vermuteten Reaktionszwischenstufen. Drittens müssen die vorgeschlagenen HiPIP-ähnlichen Zwischenstufen für weite-re Charakterisierungen (z. B. durch Mößbauer-Spektrosko-pie) in großer Ausbeute abgefangen werden, um die HiPIP-ähnliche Natur zu testen. Aus dem Blickwinkel der Inhibitor-Entwicklung stellt sich die Frage, ob man wirksame IspG/IspH-Inhibitoren erhalten kann, die in Zellen und in vivo aktiv sind. Wäre ein IspH-spezifischer Inhibitor gut oder schlecht? Dieser könnte die gewünschten Pathogene gewiss zerstören, und die begleitende Anhäufung von **4** würde $\gamma\delta$ T-Zellen aktivieren (über den V γ 2V δ 2-T-Zellrezeptor) – dies könnte allerdings zu viel des Guten sein und zur Sepsis führen.^[97] So könnten aus Gründen der Sicherheit und Effi-zienz IspG- oder kombinierte IspH + IspG-Inhibitoren be-nötigt werden.

Die Ergebnisse zu oxidiertem IspH lassen auch eine auf-regende Verbindung zwischen den $[Fe_4S_4]$ -Clustern in IspH und anderen $[Fe_4S_4]$ -Proteinen, die Ziele von Medikamenten oder Herbiziden sind, erkennen. So ist die Tatsache interes-sant, dass IspH Acetylene auf dieselbe Weise hydratisiert wie FumA, da FumA bei Malaria-parasiten ein Angriffsziel für Medikamente bietet.^[98] Ebenso sind die Enzyme Dihydroxy-säure-Dehydratase (DHAD)^[99] und Isopropylmalat-Isome-rase (IPMI)^[100] Ziele, um die Biosynthese verzweigt-kettiger Aminosäuren in Tuberkulosebakterien (in Makrophagen) zu hemmen und sind als Angriffsstellen für Herbicide interes-sant; verschiedene Inhibitoren wurden beschrieben.^[101] Einige dieser Inhibitoren könnten auch IspH und IspG hemmen, während die Leitstrukturen, die IspH und IspG hemmen, neue Ideen für DHAD- und IPMI-Inhibitoren lie-fern könnten – alle auf $[Fe_4S_4]$ -Cluster mit einem besonderen vierten Eisenatom gerichtet.

Danksagung

Diese Forschungen wurden vom United States Public Health Service (NIH-Grant GM065307) unterstützt. W.W. wurde durch ein Stipendium der American Heart Association, Mid-west Affiliate (10PRE4430022) gefördert. Wir danken unseren Mitarbeitern und Kollegen für lebhafte Diskussionen sowie Jeroen S. Dickschat und den Gutachtern für das kritische Lesen des Manuskripts und wertvolle Hinweise.

Eingegangen am 1. August 2013
Online veröffentlicht am 31. Januar 2014

Übersetzt von Margit Knauer, Bensheim

- [1] H. Beinert, R. H. Holm, E. Munck, *Science* **1997**, *277*, 653–659.
- [2] M. Bruschi, F. Guerlesquin, *FEMS Microbiol. Lett.* **1988**, *54*, 155–175.
- [3] S. Ciurli, F. Musiani, *Photosynth. Res.* **2005**, *85*, 115–131.
- [4] H. Beinert, M. C. Kennedy, C. D. Stout, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2335–2374.
- [5] D. H. Flint, R. M. Allen, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2315–2334.

- [6] H. J. Sofia, G. Chen, B. G. Hetzler, J. F. Reyes-Spindola, N. E. Miller, *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, 1097–1106.
- [7] M. Rohmer, *Lipids* **2008**, 43, 1095–1107.
- [8] M. Rohmer, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, 16, 565–574.
- [9] W. Eisenreich, A. Bacher, D. Arigoni, F. Rohdich, *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, 61, 1401–1426.
- [10] M. Rohmer, C. Grosdemange-Billiard, M. Seemann, D. Tritsch, *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2004**, 5, 154–162.
- [11] H. K. Lichtenhaller, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1999**, 50, 47–65.
- [12] P. Adam, S. Hecht, W. Eisenreich, J. Kaiser, T. Grawert, D. Arigoni, A. Bacher, F. Rohdich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 12108–12113.
- [13] B. Altincicek, E. C. Duin, A. Reichenberg, R. Hedderich, A. K. Kollas, M. Hintz, S. Wagner, J. Wiesner, E. Beck, H. Jomaa, *FEBS Lett.* **2002**, 532, 437–440.
- [14] M. Wolff, M. Seemann, B. T. S. Bui, Y. Frapart, D. Tritsch, A. G. Estrabot, M. Rodriguez-Concepcion, A. Boronat, A. Marquet, M. Rohmer, *FEBS Lett.* **2003**, 541, 115–120.
- [15] F. Rohdich, F. Zepeck, P. Adam, S. Hecht, J. Kaiser, R. Laupitz, T. Grawert, S. Amslinger, W. Eisenreich, A. Bacher, D. Arigoni, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 1586–1591.
- [16] T. Gräwert, J. Kaiser, F. Zepeck, R. Laupitz, S. Hecht, S. Amslinger, N. Schramek, E. Schleicher, S. Weber, M. Haslbeck, J. Buchner, C. Rieder, D. Arigoni, A. Bacher, W. Eisenreich, F. Rohdich, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 12847–12855.
- [17] R. C. Röhrich, N. Englert, K. Troschke, A. Reichenberg, M. Hintz, F. Seeber, E. Balconi, A. Aliverti, G. Zanetti, U. Köhler, M. Pfeiffer, E. Beck, H. Jomaa, J. Wiesner, *FEBS Lett.* **2005**, 579, 6433–6438.
- [18] Y. Xiao, L. Chu, Y. Sanakis, P. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 9931–9933.
- [19] T. Gräwert, F. Rohdich, I. Span, A. Bacher, W. Eisenreich, J. Eppinger, M. Groll, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 5867–5870; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 5756–5759.
- [20] K. Janthawornpong, S. Krasutsky, P. Chaignon, M. Rohmer, C. D. Poulter, M. Seemann, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 1816–1822.
- [21] W. Xu, N. S. Lees, D. Hall, D. Welideniya, B. M. Hoffman, E. C. Duin, *Biochemistry* **2012**, 51, 4835–4849.
- [22] C. Cole, J. D. Barber, G. J. Barton, *Nucleic Acids Res.* **2008**, 36, W197–201.
- [23] W. S. J. Valdar, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2002**, 48, 227–241.
- [24] W. Wang, K. Wang, Y.-L. Liu, J. H. No, M. J. Nilges, E. Oldfield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, 107, 4522–4527.
- [25] S. Hecht, W. Eisenreich, P. Adam, S. Amslinger, K. Kis, A. Bacher, D. Arigoni, F. Rohdich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 14837–14842.
- [26] M. Seemann, B. T. Bui, M. Wolff, D. Tritsch, N. Campos, A. Boronat, A. Marquet, M. Rohmer, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 4513–4515; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 4337–4339.
- [27] F. Zepeck, T. Grawert, J. Kaiser, N. Schramek, W. Eisenreich, A. Bacher, F. Rohdich, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 9168–9174.
- [28] M. Seemann, B. T. S. Bui, M. Wolff, M. Miginiac-Maslow, M. Rohmer, *FEBS Lett.* **2006**, 580, 1547–1552.
- [29] Y. Xiao, G. Zahariou, Y. Sanakis, P. Liu, *Biochemistry* **2009**, 48, 10483–10485.
- [30] M. Lee, T. Grawert, F. Quitterer, F. Rohdich, J. Eppinger, W. Eisenreich, A. Bacher, M. Groll, *J. Mol. Biol.* **2010**, 404, 600–610.
- [31] W. Xu, N. S. Lees, D. Adedeji, J. Wiesner, H. Jomaa, B. M. Hoffman, E. C. Duin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 14509–14520.
- [32] A. K. Kollas, E. C. Duin, M. Eberl, B. Altincicek, M. Hintz, A. Reichenberg, D. Henschker, A. Henne, I. Steinbrecher, D. N. Ostrovsky, R. Hedderich, E. Beck, H. Jomaa, J. Wiesner, *FEBS Lett.* **2002**, 532, 432–436.
- [33] Y.-L. Liu, F. Guerra, K. Wang, W. Wang, J. Li, C. Huang, W. Zhu, K. Houlihan, Z. Li, Y. Zhang, S. K. Nair, E. Oldfield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, 109, 8558–8563.
- [34] K. Okada, T. Hase, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 20672–20679.
- [35] I. Rekittke, J. Wiesner, R. Röhrich, U. Demmer, E. Warkentin, W. Xu, K. Troschke, M. Hintz, J. H. No, E. C. Duin, E. Oldfield, H. Jomaa, U. Ermler, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 17206–17207.
- [36] T. Grawert, I. Span, W. Eisenreich, F. Rohdich, J. Eppinger, A. Bacher, M. Groll, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, 107, 1077–1081.
- [37] M. Seemann, K. Janthawornpong, J. Schweizer, L. H. Bottger, A. Janoschka, A. Ahrens-Botzong, E. N. Tambou, O. Rotthaus, A. X. Trautwein, M. Rohmer, V. Schunemann, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 13184–13185.
- [38] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulter, *J. Mol. Graphics* **1996**, 14, 33–38.
- [39] I. Rekittke, T. Nonaka, J. Wiesner, U. Demmer, E. Warkentin, H. Jomaa, U. Ermler, *FEBS Lett.* **2011**, 585, 447–451.
- [40] R. R. Copley, P. Bork, *J. Mol. Biol.* **2000**, 303, 627–641.
- [41] K. E. Hevener, M. K. Yun, J. Qi, I. D. Kerr, K. Babaoglu, J. G. Hurdle, K. Balakrishna, S. W. White, R. E. Lee, *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 166–177.
- [42] T. F. Oliveira, C. Vonrhein, P. M. Matias, S. S. Venceslau, I. A. Pereira, M. Archer, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 34141–34149.
- [43] U. Swamy, M. Wang, J. N. Tripathy, S. K. Kim, M. Hirasawa, D. B. Knaff, J. P. Allen, *Biochemistry* **2005**, 44, 16054–16063.
- [44] I. Rekittke, H. Jomaa, U. Ermler, *FEBS Lett.* **2012**, 586, 3452–3457.
- [45] M. Seemann, P. Wegner, V. Schunemann, B. T. Bui, M. Wolff, A. Marquet, A. X. Trautwein, M. Rohmer, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, 10, 131–137.
- [46] Y. Xiao, Z. K. Zhao, P. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 2164–2165.
- [47] T. Gräwert, I. Span, A. Bacher, M. Groll, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 8984–8991; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 8802–8809.
- [48] W. C. Chang, Y. Xiao, H. W. Liu, P. Liu, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 12512–12515; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 12304–12307.
- [49] Y. Xiao, W. C. Chang, H. W. Liu, P. Liu, *Org. Lett.* **2011**, 13, 5912–5915.
- [50] W. Wang, K. Wang, I. Span, J. Jauch, A. Bacher, M. Groll, E. Oldfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 11225–11234.
- [51] A. Ahrens-Botzong, K. Janthawornpong, J. A. Wolny, E. N. Tambou, M. Rohmer, S. Krasutsky, C. D. Poulter, V. Schunemann, M. Seemann, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 12182–12185; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 11976–11979.
- [52] I. Span, T. Gräwert, A. Bacher, W. Eisenreich, M. Groll, *J. Mol. Biol.* **2012**, 416, 1–9.
- [53] M. M. Werst, M. C. Kennedy, H. Beinert, B. M. Hoffman, *Biochemistry* **1990**, 29, 10526–10532.
- [54] M. C. Kennedy, M. Werst, J. Telser, M. H. Emptage, H. Beinert, B. M. Hoffman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 8854–8858.
- [55] C. A. Citron, N. L. Brock, P. Rabe, J. S. Dickschat, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 4129–4133; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 4053–4057.
- [56] H. I. Lee, R. Y. Igarashi, M. Laryukhin, P. E. Doan, P. C. Dos Santos, D. R. Dean, L. C. Seefeldt, B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9563–9569.
- [57] V. Pelmenschikov, D. A. Case, L. Noodleman, *Inorg. Chem.* **2008**, 47, 6162–6172.
- [58] J. A. J. Jarvis, B. T. Kilbourn, P. G. Owston, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1971**, 27, 366–372.

- [59] J. Li, K. Wang, T. I. Smirnova, R. L. Khade, Y. Zhang, E. Oldfield, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 6650–6653; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6522–6525.
- [60] L. Zhao, W. C. Chang, Y. Xiao, H. W. Liu, P. Liu, *Annu. Rev. Biochem.* **2013**, *82*, 497–530.
- [61] H. J. McManus, R. W. Fessenden, D. M. Chipman, *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 3778–3781.
- [62] M. Belinskii, *Chem. Phys.* **1993**, *172*, 189–211.
- [63] C. R. Staples, E. Ameyibor, W. Fu, L. Gardet-Salvi, A. L. Stritt-Etter, P. Schurmann, D. B. Knaff, M. K. Johnson, *Biochemistry* **1996**, *35*, 11425–11434.
- [64] C. R. Staples, E. Gaymard, A. L. Stritt-Etter, J. Telser, B. M. Hoffman, P. Schurmann, D. B. Knaff, M. K. Johnson, *Biochemistry* **1998**, *37*, 4612–4620.
- [65] E. M. Walters, R. Garcia-Serres, G. N. Jameson, D. A. Glauser, F. Bourquin, W. Manieri, P. Schurmann, M. K. Johnson, B. H. Huynh, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9612–9624.
- [66] W. Wang, J. Li, K. Wang, C. Huang, Y. Zhang, E. Oldfield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 11189–11193.
- [67] W. Wang, K. Wang, J. Li, S. Nellutla, T. I. Smirnova, E. Oldfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8400–8403.
- [68] I. Span, K. Wang, W. Wang, J. Jauch, W. Eisenreich, A. Bacher, E. Oldfield, M. Groll, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 2172–2175; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 2118–2121.
- [69] W. Brandt, M. A. Dessoy, M. Fulhorst, W. Gao, M. H. Zenk, L. A. Wessjohann, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 311–323.
- [70] Y. Xiao, D. Rooker, Q. You, C. L. Meyers, P. Liu, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 527–530.
- [71] T. Itoh, T. Nagano, M. Sato, M. Hirobe, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 6387–6388.
- [72] R. L. Nyland II, Y. Xiao, P. Liu, C. L. F. Meyers, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17734–17735.
- [73] Y. Xiao, R. L. Nyland II, C. L. F. Meyers, P. Liu, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7220–7222.
- [74] D. Adedeji, H. Hernandez, J. Wiesner, U. Kohler, H. Jomaa, E. C. Duin, *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 279–283.
- [75] A. Silakov, B. Wenk, E. Reijerse, S. P. Albracht, W. Lubitz, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, 301–313.
- [76] A. S. Hashmi, G. J. Hutchings, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 8064–8105; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7896–7936.
- [77] M. J. Calhorda, A. M. Galvao, C. Unalerooglu, A. A. Zlota, F. Frolow, D. Milstein, *Organometallics* **1993**, *12*, 3316–3325.
- [78] Z. H. Kafafi, R. H. Hauge, W. E. Billups, J. L. Margrave, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 4775–4780.
- [79] I. Bertini, F. Capozzi, C. Luchinat, M. Piccioli, A. J. Vila, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 651–660.
- [80] L. Charon, J. F. Hoeffler, C. Pale-Grosdemange, L. M. Lois, N. Campos, A. Boronat, M. Rohmer, *Biochem. J.* **2000**, *346*, 737–742.
- [81] E. Oldfield, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 1216–1226.
- [82] C. Obiol-Pardo, J. Rubio-Martinez, S. Imperial, *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 1325–1338.
- [83] W. N. Hunter, *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 2048–2059.
- [84] S. Van Hoof, C. J. Lacey, R. C. Röhrich, J. Wiesner, H. Jomaa, S. Van Calenbergh, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1365–1370.
- [85] A. Reichenberg, M. Hintz, Y. Kletschek, T. Kuhl, C. Haug, R. Engel, J. Moll, D. N. Ostrovsky, H. Jomaa, M. Eberl, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1257–1260.
- [86] M. Eberl, M. Hintz, A. Reichenberg, A.-K. Kollas, J. Wiesner, H. Jomaa, *FEBS Lett.* **2003**, *544*, 4–10.
- [87] R. S. McMillan, J. Renaud, J. G. Reynolds, R. H. Holm, *J. Inorg. Biochem.* **1979**, *11*, 213–227.
- [88] K. Tanaka, M. Nakamoto, M. Tsunomori, T. Tanaka, *Chem. Lett.* **1987**, 613–616.
- [89] K. Wang, W. Wang, J. H. No, Y. Zhang, Y. Zhang, E. Oldfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6719–6727.
- [90] W. Wang, J. Li, K. Wang, T. I. Smirnova, E. Oldfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6525–6528.
- [91] I. Span, K. Wang, W. Wang, Y. Zhang, A. Bacher, W. Eisenreich, K. Li, C. Schulz, E. Oldfield, M. Groll, *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1042.
- [92] D. H. Flint, R. G. McKay, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5534.
- [93] D. H. Flint, *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *311*, 509–516.
- [94] G. B. Seiffert, G. M. Ullmann, A. Messerschmidt, B. Schink, P. M. Kroneck, O. Einsle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 3073–3077.
- [95] F. Tenbrink, B. Schink, P. M. Kroneck, *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 1229–1236.
- [96] A. Parthasarathy, A. J. Pierik, J. Kahnt, O. Zelder, W. Buckel, *Biochemistry* **2011**, *50*, 3540–3550.
- [97] M. S. Davey, C. Y. Lin, G. W. Roberts, S. Heuston, A. C. Brown, J. A. Chess, M. A. Tolman, C. G. Gahan, C. Hill, T. Parish, J. D. Williams, S. J. Davies, D. W. Johnson, N. Topley, B. Moser, M. Eberl, *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1002040.
- [98] V. Bulusu, V. Jayaraman, H. Balaram, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 9236–9245.
- [99] V. Singh, D. Chandra, B. S. Srivastava, R. Srivastava, *Microbiology* **2011**, *157*, 38–46.
- [100] K. Jensen, U. D. Ranganathan, K. K. Van Rompay, D. R. Canfield, I. Khan, R. Ravindran, P. A. Luciw, W. R. Jacobs Jr., G. Fennelly, M. H. Larsen, K. Abel, *Clin. Vaccine Immunol.* **2012**, *19*, 1170–1181.
- [101] D. H. Flint, A. Nudelman, *Bioorg. Chem.* **1993**, *21*, 367–385.