

Pseudokontaktverschiebungen lokalisieren Eisen(III) in der zweikernigen Metallo- β -Laktamase IMP-1**

Thomas J. Carruthers, Paul D. Carr, Choy-Theng Loh, Colin J. Jackson und Gottfried Otting*

Abstract: Heterozweikernige Metalloenzyme bilden eine bedeutende Klasse von Metalloproteinen, bei denen jedoch die Bestimmung der Positionen der Metallionen schwierig sein kann. Hier beschreiben wir ein neues NMR-Verfahren, das Pseudokontaktverschiebungen (PCS) nutzt, um die Position von Metallionen ohne Annahmen über die koordinierenden Liganden zu ermitteln. Die Methode wird anhand des zweikernigen [FeZn]-Komplexes von IMP-1 beschrieben. IMP-1 ist ein Prototyp der Metallo- β -Laktamasen ($M\beta L$), die Resistenz gegen β -Laktam-Antibiotika bewirken. Eine versuchte Einkristall-Röntgenstrukturanalyse wurde durch teilweise Oxidation des Proteins während der Kristallisation beeinträchtigt. Mit [GaZn]-IMP-1 als diamagnetischer Referenz ermittelten die PCSs eindeutig die Eisen-Bindungsstelle in frischen Proben von [FeZn]-IMP-1, obwohl die beiden Metallzentren weniger als 3.8 Å auseinander liegen und das Eisen als High-Spin-Fe³⁺ vorliegt, welches nur kleine PCSs erzeugt. [FeZn]-M β Ls könnten bedeutende pharmazeutische Zielproteine darstellen, da [FeZn]-IMP-1 enzymatisch aktiv ist und schon bei geringen Konzentrationen an Fe³⁺ auftritt.

Schätzungsweise bis zur Hälfte aller Proteine enthalten Metallionen als Cofaktor.^[1] Während sich die Protein-Metall-Stöchiometrie leicht durch induktiv gekoppelte plasmaoptische Emmisionsspektroskopie (ICP-OES) oder Atomabsorptionsspektroskopie erfassen lässt, ist die genaue Position der Metallionen viel schwieriger zu bestimmen, insbesondere in heterozweikernigen aktiven Zentren. Zwei nah benachbarte Metallionen bilden ein häufiges Motiv in Metalloenzymen, und die Übergangsmetallionen Zink und Eisen treten besonders oft auf.^[2] Etablierte Methoden wie EXAFS-(extended X-ray absorption fine structure) und Elektronenspinresonanz(ESR)-Spektroskopie liefern Information zur Metallkoordinationsphäre, aber die Verknüpfung dieser

Daten mit spezifischen Metallbindungsstellen benötigt unabhängige Informationen zur Identität und Geometrie der Aminosäureseitenketten. Außerdem sind diese Methoden unter Umständen schon auf 10 % Verunreinigungen anfällig. Die Röntgenkristallographie liefert Strukturen mit atomarer Auflösung, aber erfordert Einkristalle, die oft schwierig herzustellen sind und sehr spezifische Kristallisationsbedingungen benötigen. Selbst dann erfordert die unabhängige Bestimmung der Metallionenpositionen anormale Röntgenstreuungsexperimente, die sich unter Umständen nur schwer interpretieren lassen, wenn eine zweikernige Bindungsstelle verschiedene Metalle mit unterschiedlicher Besetzung beherbergt. Unter Verwendung von NMR-Spektroskopie zeigen wir, dass Pseudokontaktverschiebungen (PCS), die von einem paramagnetischen Ion erzeugt werden, genügend Information beinhalten, um die Position des paramagnetischen Zentrums mit einer Genauigkeit von wenigen Ångström zu bestimmen, selbst für einen schwierigen Kern wie High-Spin-Fe³⁺, der große paramagnetische Relaxationsverstärkungen (PRE) und nur kleine PCSs generiert.^[3] Die Methode setzt die Kenntnis der Rückgratstruktur des Proteins voraus, aber macht keinerlei Annahmen zur Metallkoordination. Am Beispiel des 25 kDa großen M β L-Proteins IMP-1 etablierten wir, dass das Enzym mit Leichtigkeit ein heterozweikerniges aktives Zentrum mit [FeZn] annimmt, identifizierten das Eisen als High-Spin-Fe³⁺ und lokalisierten es in einer der beiden Metallbindungsstellen mit eindeutiger Unterscheidung der beiden Zentren, die innerhalb von 3.8 Å liegen.

IMP-1 ist der Prototyp von über 40 Mitgliedern der B1-Klasse von M β L-Proteinen, die zunehmende Gesundheitsrisiken durch Breitbandresistenz gegen β -Laktam-Antibiotika inklusive Carbapeneme bewirken.^[4] Lokalisiert auf mobilen genetischen Elementen ist IMP-1 in Krankenhäusern in verschiedenen pathogenen Bakterienstämmen gefunden worden.^[5] Verfügbare Kristallstrukturen von IMP-1 wurden mit zwei Zinkatomen im aktiven Zentrum modelliert.^[6,7] Die Metallionen sind für die Aktivität und strukturelle Integrität des Enzyms unentbehrlich.

Wir entdeckten mithilfe von ICP-OES, dass IMP-1, wenn es durch In-vivo-Überexpression in *Escherichia coli* im Beisein geringer Mengen (25 µM) FeCl₃ im Medium hergestellt wird, Eisen und Zink in äquimolaren Mengen aufnimmt. Sogar ein zehnfacher Überschuss an Zink vermochte die Aufnahme von Eisen nur unvollständig zu verhindern. [FeZn]-IMP-1 war enzymatisch aktiv (Hintergrundinformationen, Tabelle S1).

Zur Identifizierung der Eisenbindungsstelle und der Verteilung von Eisen und Zink zwischen den beiden Metallbindungsstellen M₁ und M₂ versuchten wir zunächst, die

[*] T. J. Carruthers, Dr. P. D. Carr, Dr. C.-T. Loh, Dr. C. J. Jackson, Prof. G. Otting
Research School of Chemistry, Australian National University
Canberra, ACT 2601 (Australia)
E-Mail: gottfried.ötting@anu.edu.au

[**] Wir danken dem Australian Research Council für finanzielle Unterstützung, A/Prof. Gerhard Schenk und Dr. Peter Vela für einen pET-47b(+)-Expressionsvektor mit bla_{IMP1}-Gen, Dr. Ruhu Qi für Hilfe mit dem Klonieren, Ellen Cliff, Jia Jiunn Chew, Jeremy Neeman und Kately Dugdale für Hilfe bei der Herstellung selektiv ¹⁵N-markierter Proben, Vicki Withers für Hilfe mit ICP-OE-Messungen, Prof. Thomas Huber und Dr. Thitima Urathamakul für Hilfe mit der Massenspektrometrie und Angestellten des australischen Synchrotrons für Hilfestellung bei den Röntgenexperimenten.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201408693> zu finden.

Einkristallstruktur zu bestimmen. Einkristalle erwiesen sich jedoch als schwer erhältlich. Das schlussendlich erfolgreiche Protokoll benötigte mehrere Wochen für das Kristallwachstum, Inkubation bei 37°C und die Verwendung hoher Konzentrationen des Metallionenchelatbildners Natriumcitrat, was zu verringerten Metallbesetzungen führte. Während die Gesamtstruktur des Proteins (PDB-Code 4UAM) dieselbe war wie die früher bestimmte Struktur des Wildtyp-[ZnZn]-Enzyms,^[6] wies die Elektronendichtevertteilung darauf hin, dass die Kristallisationsbedingungen zur teilweisen Oxidation des Cystein-Restes im aktiven Zentrum zu Sulfat geführt hatten, mit unklarem Einfluss auf die Metallbindungspräferenzen der beiden Bindungsstellen (Abbildung 1 A und B). Das Eisenion wurde durch anomale Röntgenstreuung oberhalb der Fe-K- und Zn-K-Kanten in der tiefer begrabenen M₁-Stelle lokalisiert (Abbildung 1 C–F).^[8]

Um die Position des Eisens in frischen Lösungen von IMP-1 zu verifizieren, führten wir NMR-Experimente ohne Citrat durch. Im Vergleich zu [ZnZn]-IMP-1 fehlten in den NMR-Spektren von [FeZn]-IMP-1 die ¹⁵N-HSQC-Kreuzpeaks der Amide in der Nähe des aktiven Zentrums, und Kreuzpeaks der weiter entfernten Amide waren durch PREs abgeschwächt (Abbildung 3A). Die PRE-Daten waren jedoch unzureichend genau, um die beiden Metallbindungsstellen voneinander zu unterscheiden (Abbildung S8). Die Unterscheidung zwischen den beiden Metallbindungsstellen gelang hingegen durch PCS-Messungen unter Verwendung von [FeZn]-IMP-1-Proben und dem diamagnetischen Analogon [GaZn]-IMP-1.

Die sequenzspezifische Resonanzzuordnung von IMP-1 wurde durch einheitlich ¹⁵N/¹³C- und ¹⁵N/¹³C/²H-markierte Proben des [ZnZn]-Komplexes ermittelt, die *in vivo* in Gegenwart eines großen Überschusses an Zink im Medium hergestellt wurden. Die Resonanzzuordnungen des Rückgrats des diamagnetischen Komplexes ließen sich ohne Weiteres auf den [FeZn]-Komplex übertragen, da die chemischen Verschiebungen sich nur wenig zwischen den beiden Formen des Proteins unterschieden. Die Resonanzzuordnungen wurden in der BioMagResBank unter den Codes 25063 und 25080 hinterlegt. Für PCS-Messungen wurden die [FeZn]- und [GaZn]-Komplexe durch zellfreie Proteinsynthese^[10] mit selektiv ¹⁵N-markierten Aminosäuren unter kontrollierter Zufuhr an Metallionen hergestellt.

Die meisten paramagnetischen Metallionen sind durch einen magnetischen Suszeptibilitätstensor gekennzeichnet, der anisotrop ist und deshalb PCSs im Metallion-bindenden Protein erzeugt. Die PCSs entstehen durch direkte Wechselwirkungen zwischen den Kernspins und dem paramagnetischen Zentrum. Sie hängen von der Position des Metallions ab sowie von der Orientierung des $\Delta\chi$ -Tensors, der die Anisotropie der magnetischen Suszeptibilität beschreibt, relativ zum Protein. Der PCS $\Delta\delta^{\text{PCS}}$ eines Kernspins wird in ppm gemessen und durch die folgende Gleichung beschrieben,^[11]

$$\Delta\delta^{\text{PCS}} = \frac{1}{12\pi r^3} \left[\Delta\chi_{\text{ax}}(3\cos^2\theta - 1) + \frac{3}{2}\Delta\chi_{\text{rh}}\sin^2\theta\cos 2\phi \right] \quad (1)$$

in der r , θ und ϕ die Polarkoordinaten des Kernspins in Bezug auf die Hauptachsen des $\Delta\chi$ -Tensors bezeichnen, dessen

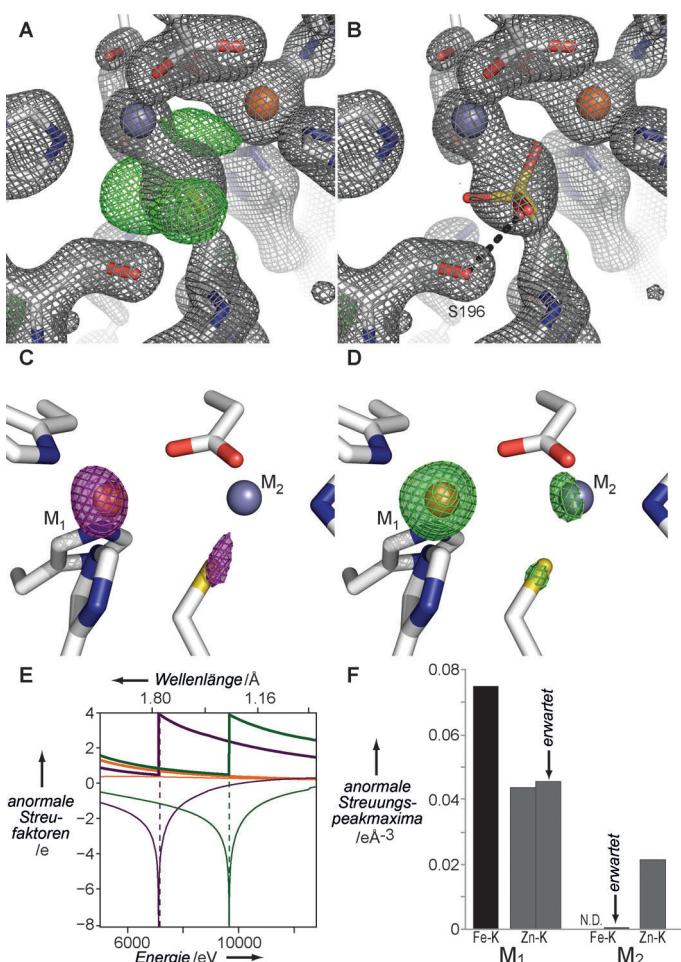


Abbildung 1. Aktives Zentrum von [FeZn]-IMP-1, bestimmt durch Röntgenkristallographie. Die 1.8 Å-Struktur kristallisierte mit einem Citrat-Molekül im aktiven Zentrum (nicht gezeigt). Die Metalle in den M₁- und M₂-Bindungsstellen werden jeweils von drei Histidinen bzw. einem Histidin, einem Aspartat und einem Cystein koordiniert und sind als orange bzw. graue Kugeln gezeichnet. Die Aminosäurereste des aktiven Zentrums sind als Stäbe dargestellt. Die Elektronendichte entsprach ungefähr 80% Besetzung der M₁-Stelle durch Fe³⁺ und 40% Besetzung der M₂-Stelle durch Zn²⁺. A) Elektronendichtevertteilung 2mF₀–DF_c (graues Gitter bei 2.5 σ) des aktiven Zentrums. Die Differenzverteilung mF₀–DF_c (grünes Gitter bei 4 σ) wies drei Regionen mit positiver Elektronendichte um den Schwefel von Cys158 auf, was auf teilweise Oxidation hinwies. B) Wie (A), außer dass Cys158 zusätzlich durch zwei Konformere Cysteinsulfinsärcher Säure modelliert wurde, beide mit einer Wasserstoffbrücke zu Ser196. C) Anormale Streuungsverteilung, gemessen oberhalb der Fe-K-Kante, zur Hervorhebung der Eisenposition. D) Wie (C), außer dass die Streuungsverteilung an der Zn-K-Kante gemessen wurde, um die Positionen von Eisen und Zink hervorzuheben. Die Konturen wurden so gewählt, dass ein vergleichbares Streuungsniveau am Schwefelatom von Cys158 zu sehen ist. E) Wellenlängen der anormalen Streuungsexperimente, gekennzeichnet durch gestrichelte Linien in einem Graph der theoretischen anormalen Streuungsfaktoren f' (dünne Linien) und f'' (dicke Linien) für Eisen (lila), Zink (grün) und Schwefel (orange).^[9] F) Anormale Streuungsspeakmaxima an den M₁- und M₂-Bindungsstellen. Das experimentelle anormale Streuungsspeakmaximum, das oberhalb der Zn-K-Kante an der M₁-Bindungsstelle gemessen wurde, entspricht den Erwartungen für eine M₁-Bindungsstelle, die nur Eisen enthält.^[9] Aufgrund der geringen Metallbesetzung der M₂-Bindungsstelle wurde kein anormales Streuungssignal in der M₂-Bindungsstelle oberhalb der Fe-K-Kante gefunden, was den Erwartungen für eine M₂-Bindungsstelle entspricht, die nur Zink enthält.

Größe durch die axialen und rhombischen Komponenten $\Delta\chi_{ax}$ bzw. $\Delta\chi_{rh}$ beschrieben wird. Der $\Delta\chi$ -Tensor lässt sich vollständig durch acht Parameter beschreiben (die x -, y - und z -Koordinaten des Metallions, die α -, β - und γ -Eulerwinkel, die die Orientierung des $\Delta\chi$ -Tensors relativ zu den Proteinkoordinaten bestimmen, und $\Delta\chi_{ax}$ und $\Delta\chi_{rh}$). PCS-Messungen von mindestens acht verschiedenen Spins reichen somit zur Bestimmung des $\Delta\chi$ -Tensors inklusive der Lage seines Ursprungs.^[11,12]

PCS-Daten wurden als chemische Verschiebungen von Amidprotonen in [FeZn]-IMP-1 minus den entsprechenden chemischen Verschiebungen in einer diamagnetischen Probe gemessen. Alle PCS-Werte waren sehr klein (< 0.12 ppm). [ZnZn]-IMP-1 erwies sich als unzulänglich als diamagnetische Referenz, was auf kleine Änderungen in den chemischen Verschiebungen aufgrund der unterschiedlichen Oxidationsstufen der Metalle (Fe^{3+} versus Zn^{2+}) zurückgeführt werden kann. Die Unzulänglichkeit von [ZnZn]-IMP-1 als diamagnetische Referenz wurde in den ^{15}N -HSQC-Spektren der selektiv ^{15}N -markierten Proben besonders offensichtlich. Beispielsweise waren die ^{15}N -HSQC-Kreuzpeaks oft in verschiedenen Richtungen entlang der ^{15}N - und 1H -Dimensionen verschoben (Abbildung 2, jeweils obere Reihe). Da im Vergleich zum Abstand vom paramagnetischen Zentrum die Stickstoff- und Wasserstoffatome jeder Amidgruppe sehr nahe zueinander liegen, sind für beide Kerne sehr ähnliche PCSs zu erwarten.^[13] Dies ist in der Tat der Fall, wenn man die [FeZn]- mit den [GaZn]-Proben vergleicht (Abbildung 2, jeweils untere Reihe), was auf Eisen in der Oxidationsstufe 3+,

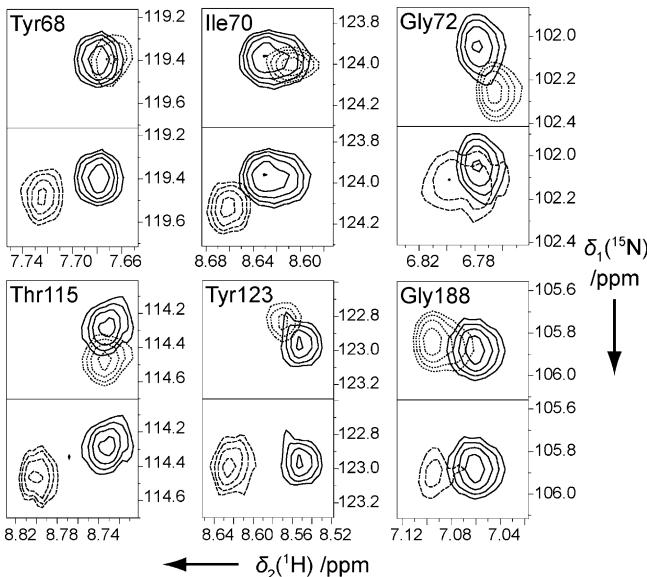


Abbildung 2. Ausgewählte spektrale Regionen der ^{15}N -HSQC-Spektren von mit ^{15}N -Glycin, ^{15}N -Isoleucin, ^{15}N -Threonin bzw. ^{15}N -Tyrosin markierten Proben der [FeZn]-, [ZnZn]- und [GaZn]-Komplexe von IMP-1. Die Spektren wurden von $50 \mu M$ Lösungen von IMP-1 in 20 mM MES-Puffer, pH 6.5, bei $37^\circ C$ auf einem Bruker 800-MHz-NMR-Spektrometer gemessen. Jeweils obere Reihe: Überlagerung der ^{15}N -HSQC-Spektren des [ZnZn]- (gepunktete Linien) und des [FeZn]-Komplexes (durchgezogene Linien). Jeweils untere Reihe: Überlagerung der ^{15}N -HSQC-Spektren des [GaZn]- (gestrichelte Linien) und des [FeZn]-Komplexes (durchgezogene Linien).

in der Gallium und Eisen sehr ähnliche Ionenradien besitzen, hinweist.

Insgesamt 48 PCSs wurden mit [GaZn]-IMP-1 als diamagnetische Referenz gemessen und als Input für das Programm PyParaTools verwendet,^[14] um $\Delta\chi$ -Tensoren in Bezug auf die Kristallstruktur des [FeZn]-Komplexes zu ermitteln. Die systematische Suche nach der am besten passenden Lage des paramagnetischen Zentrums in einem Koordinatennetz ergab die M_1 -Bindungsstelle (Abbildung 3).

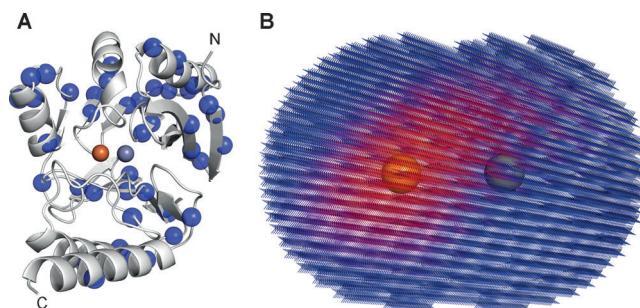


Abbildung 3. Ermittlung des paramagnetischen Zentrums mithilfe von PCS-Daten. Die M_1 - und M_2 -Metallbindungsstellen in der aktiven Stelle von IMP-1 sind als orange bzw. graue Kugeln repräsentiert. A) Schematische Darstellung der Kristallstruktur von [FeZn]-IMP-1. Blaue Kugeln heben die Rückgrat-Amide aller Aminosäurereste hervor, für die wir PCS-Daten messen konnten. Aufgrund von PREs sind alle diese Amide mindestens 11.5 \AA von der M_1 -Bindungsstelle entfernt. B) Graphische Darstellung einer Koordinatennetzsuche in der Umgebung des aktiven Zentrums nach Metallpositionen mit mittlerer quadratischer Abweichung (RMSD) zwischen experimentellen und rückgerechneten PCS-Daten. Die Netzpunkte sind durch Kreuze markiert, die gemäß der RMSD-Werte von rot (0.023 ppm) nach blau (0.028 ppm oder größer) gefärbt sind. Die besten Ergebnisse sind um die M_1 -Bindungsstelle konzentriert.

Zur Bestimmung der Oxidationsstufe und des Spin-Zustandes des Eisens wurde die gesamte paramagnetische Suszeptibilität von [FeZn]-IMP-1 mithilfe des Experiments von Evans et al.^[15] gemessen. Das Ergebnis zeigte den High-Spin-Zustand mit fünf ungepaarten Elektronen an und bestätigte somit die Oxidationsstufe des Eisens als Fe^{3+} (Abbildung S12).

Nach unserem Wissen ist dies das erste Mal, dass PCSs dazu verwendet wurden, um die genaue Position eines Fe^{3+} -Ions in einem Protein zu bestimmen. High-Spin- Fe^{3+} ist bekannt für einen großen, aber im Wesentlichen isotropen, magnetischen Suszeptibilitätstensor, der mit großen PREs und kleinen PCSs verknüpft ist.^[3] Nichtsdestotrotz ist es viel leichter, präzise PCSs zu messen als PREs, was zum Teil auf die relative Unempfindlichkeit der PCSs auf Proteinbewegungen und unspezifische intermolekulare Effekte zurückzuführen ist. Um die kleinen PCSs von Fe^{3+} zu messen, erwies sich jedoch eine geeignete diamagnetische Referenz als unabdingbar. Ga^{3+} stellt ein etabliertes strukturelles Analogon von Fe^{3+} in zweikernigen Metalloenzymen dar.^[16] Im Beispiel von IMP-1 ist der [GaZn]-Komplex auf subtile Weise nicht genau gleich strukturiert wie der [ZnZn]-Komplex, da sich chemische Verschiebungsdifferenzen in großem Abstand von der Metallbindungsstelle beobachten ließen.

Die vorliegende Arbeit beleuchtet die Schwierigkeiten, die sich mit der Bestimmung von Identität, Position und Oxidationsstufe von Übergangsmetallionen in zweikernigen Enzymen ergeben, zumal die Metallionen die Bindungsstellen heterogen besetzen können (z.B. [FeZn] versus [ZnFe]). Die hier eingeführte NMR-Methode stellt deshalb ein einzigartiges Instrument zur Analyse von Metalloenzymen dar. Zusätzlich würde sich das Vorliegen signifikanter Heterogenität in der Metallzusammensetzung oder Lokalisierung der Metalle leicht durch NMR-Spektroskopie detektieren lassen. Mittels direkter Detektion von ^{13}C oder ^{15}N kann die Genauigkeit der Bestimmung des paramagnetischen Zentrums weiter erhöht werden, unter der Voraussetzung, dass das Protein in hohen Konzentrationen löslich ist.^[17]

Es ist von Interesse, Spekulationen zur biologischen Bedeutung der Eisen-Zink-Promiskuität von IMP-1 anzustellen. Es ist gut bekannt, dass Eisen bakterielles Wachstum fördert und dass Bakterien besonders während der Zellteilung empfindlich auf β -Laktam-Antibiotika sind. Deshalb könnte die Aufrechterhaltung von aktivem Enzym durch den Ersatz von Zink durch Eisen von Vorteil sein, wenn Zink wenig verfügbar ist, aber Eisen das bakterielle Wachstum fördert.

Obwohl Fe^{3+} -haltige aktive Stellen mit gemischten Metallen häufig in zweikernigen Metallohydrolasen auftreten^[18] und eine Glyoxalase II in der weiteren Metallo- β -Laktamase-Superfamilie mit Fe^{3+} in einem zweikernigen [FeZn]-Zentrum als aktiv nachgewiesen wurde,^[19] wurde bislang von allen zweikernigen M β Ls der Unterklassen B1–B3 angenommen, als reine Zink-Enzyme zu agieren.^[20] L1, eine M β L der Unterkasse B3, ist bisher die einzige M β L, die als [FeZn]-M β L genauer untersucht wurde und für die enzymatische Aktivität mit substöchiometrischen Mengen an Eisen nachgewiesen wurde.^[21] Die leichte Bildung und signifikante enzymatische Aktivität des [FeZn]-Komplexes teilt IMP-1 wahrscheinlich mit vielen anderen Mitgliedern der M β L-B1-Unterkasse, die die klinisch wichtigste Unterkasse darstellen.^[4] Die leichte Aufnahme von Fe^{3+} stellt eine neue Herausforderung für die Medikamentenentwicklung dar.

Eingegangen am 31. August 2014
Online veröffentlicht am 15. Oktober 2014

Stichwörter: IMP-1 · Metallo- β -Laktamase · NMR-Spektroskopie · Pseudokontaktverschiebung · Zweikernige Metalloenzyme

[1] K. J. Waldron, J. C. Rutherford, D. Ford, N. J. Robinson, *Nature* **2009**, *460*, 823–830.

- [2] N. Sträter, W. N. Lipscomb, T. Klabunde, B. Krebs, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2024–2055; *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2158–2191.
- [3] I. Bertini, C. Luchinat, *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *150*, 1–264.
- [4] W.-H. Zhao, Z.-Q. Hu, *Crit. Rev. Microbiol.* **2011**, *37*, 214–226.
- [5] T. R. Walsh, M. A. Toleman, L. Poirel, P. Nordmann, *Clin. Microbiol. Rev.* **2005**, *18*, 306–325.
- [6] a) N. O. Concha, C. A. Janson, P. Rowling, S. Pearson, C. A. Cheever, B. P. Clarke, C. Lewis, M. Galleni, J.-M. Frère, D. J. Payne, J. H. Bateson, S. S. Abdel-Meguid, *Biochemistry* **2000**, *39*, 4288–4298; b) J. H. Toney, G. G. Hammond, P. M. D. Fitzgerald, N. P. Sharma, J. M. Balkovec, G. P. Rouen, S. H. Olson, M. L. Hammond, M. L. Greenlee, Y.-D. Gao, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 31913–31918; c) H. Kurosaki, Y. Yamaguchi, T. Higashi, K. Soga, S. Matsueda, H. Yumoto, S. Misumi, Y. Yamagata, Y. Arakawa, M. Goto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3861–3864; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 3929–3932; d) H. Kurosaki, Y. Yamaguchi, H. Yasuzawa, W. Jin, Y. Yamagata, Y. Arakawa, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 969–972.
- [7] a) Y. Yamaguchi, T. Kuroki, H. Yasuzawa, T. Higashi, W. Jin, A. Kawanami, Y. Yamagata, Y. Arakawa, H. Kurosaki, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1979–1983; b) L. B. Horton, S. Shanker, R. Mikulski, N. G. Brown, K. J. Phillips, E. Lykissa, B. V. Venkataram Prasad, T. Palzkill, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 5667–5677.
- [8] C. J. Jackson, P. D. Carr, H.-K. Kim, J.-W. Liu, P. Herrald, N. Mitić, G. Schenk, C. A. Smith, D. L. Ollis, *Biochem. J.* **2006**, *397*, 501–508.
- [9] E. A. Merritt, <http://skuld.bmsc.washington.edu/scatter>.
- [10] K. Ozawa, M. J. Headlam, P. M. Schaeffer, B. R. Henderson, N. E. Dixon, G. Otting, *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 4084–4093.
- [11] I. Bertini, C. Luchinat, G. Parigi, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2002**, *40*, 249–273.
- [12] C. Schmitz, M. J. Stanton-Cook, X.-C. Su, G. Otting, T. Huber, *J. Biomol. NMR* **2008**, *41*, 179–189.
- [13] M. John, G. Otting, *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 2309–2313.
- [14] M. Stanton-Cook, X.-C. Su, G. Otting, T. Huber, <http://comp-bio.anu.edu.au/mscook/PPT>.
- [15] a) D. F. Evans, *J. Chem. Soc.* **1959**, 2003–2005; b) S. K. Sur, *J. Magn. Reson.* **1989**, *82*, 169–173.
- [16] a) M. Merkx, B. A. Averill, *Biochemistry* **1998**, *37*, 8490–8497; b) S. J. Smith, A. Casellato, K. S. Hadler, N. Mitić, M. J. Riley, A. J. Bortoluzzi, B. Szpoganicz, G. Schenk, A. Neves, L. R. Gahan, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12*, 1207–1220.
- [17] C. Caillet-Saguy, M. Delepiere, A. Lecroisey, I. Bertini, M. Piccioli, P. Turano, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 150–158.
- [18] N. Mitić, S. J. Smith, A. Neves, L. W. Guddat, L. R. Gahan, G. Schenk, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3338–3363.
- [19] O. Schilling, N. Wenzel, M. Naylor, A. Vogel, M. Crowder, C. Makaroff, W. Meyer-Klaucke, *Biochemistry* **2003**, *42*, 11777–11786.
- [20] C. Bebrone, *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *74*, 1686–1701.
- [21] a) Z. Hu, T. S. Gunasekera, L. Spadofora, B. Bennett, M. W. Crowder, *Biochemistry* **2008**, *47*, 7947–7953; b) Z. Hu, G. Perriyannan, B. Bennett, M. W. Crowder, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14207–14216.