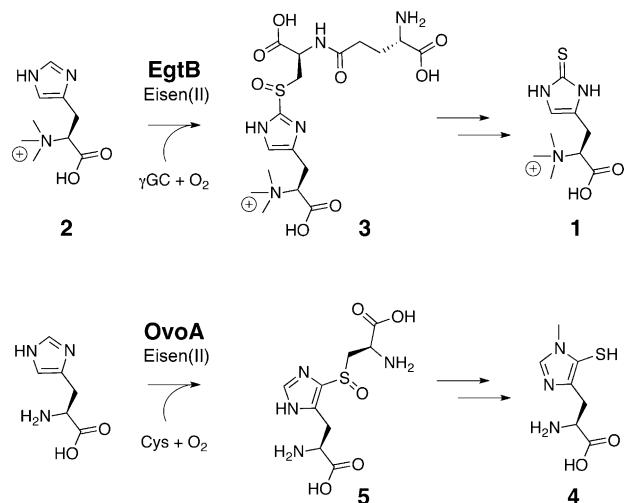


# Struktur der Sulfoxid-Synthase EgtB aus der Ergothionein-Biosynthese\*\*

Kristina V. Goncharenko, Allegra Vit, Wulf Blankenfeldt\* und Florian P. Seebeck\*

**Abstract:** Das eisenhaltige Nicht-Häm-Enzym EgtB katalysiert die sauerstoffabhängige Bildung einer Kohlenstoff-Schwefel-Bindung zwischen  $\gamma$ -Glutamylcystein und N- $\alpha$ -Trimethylhistidin als zentralen Schritt der Ergothionein-Biosynthese. Sowohl die katalytische Aktivität als auch die 3D-Struktur von EgtB unterscheiden sich von bisher bekannten Schwefel-Transferasen oder Thiol-Dioxygenasen. Die Kristallstruktur von EgtB aus *Mycobacterium thermoresistibile* im Komplex mit  $\gamma$ -Glutamylcystein und N- $\alpha$ -Trimethylhistidin zeigt die zwei Substrate und drei Histidinreste als Liganden der oktaedrischen Eisenbindestelle. Diese Geometrie des aktiven Zentrums passt zu einem katalytischen Mechanismus, in dem die Bildung der Kohlenstoff-Schwefel-Bindung von einem Eisen(III)-komplexierten Thiyil-Radikal initiiert wird, indem dieses den Imidazolring des N- $\alpha$ -Trimethylhistidins angreift.

Ergothionein (**1**, Schema 1) kommt in vielen pro- und eukaryotischen Organismen vor, einschließlich dem Menschen und Humanpathogenen wie *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>[1]</sup> Es wird von höheren Eukaryoten als bakteriell produzierter Mikronährstoff aufgenommen. Die genaue zelluläre Funktion von Ergothionein ist unklar, jedoch lassen jüngste Beobachtungen in bakteriellen, tierischen und pilztämmigen Zellen darauf schließen, dass die Schwefelverbindung vor oxidativem Stress schützt.<sup>[2]</sup> Mycobakterien synthetisieren Ergothionein aus Glutamat, Cystein und Histidin.<sup>[1d,3]</sup> Der zentrale Schritt in dieser Biosynthese wird von dem eisenhaltigen Nicht-Häm-Enzym EgtB katalysiert, das unter Sauerstoffverbrauch eine C-S-Bindung zwischen N- $\alpha$ -Trimethylhistidin (**2**, TMH) und  $\gamma$ -Glutamylcystein ( $\gamma$ GC) bildet und sulfoxidiert. Zusammen mit dem Ovothiol-Biosynthese-enzym OvoA<sup>[4]</sup> (**4**, Schema 1) repräsentiert EgtB eine sepa-



**Schema 1.** EgtB und OvoA katalysieren die Bildung und Sulfoxidierung von C-S-Bindungen zwischen  $\gamma$ -Glutamylcystein und N- $\alpha$ -Trimethylhistidin (TMH) oder zwischen Cystein und Histidin als zentralen Schritt der Biosynthesen von Ergothionein (**1**) und Ovothiol (**4**).

rate Enzymklasse (Sulfoxid-Synthasen), die sich von anderen Schwefel oxidierenden oder C-S-kuppelnden eisenhaltigen Enzymen wie Cystein-Dioxygenasen oder Isopenicillin-Synthasen abgrenzt.<sup>[5]</sup> Vielmehr stellen Sulfoxid-Synthasen eine neue Facette in der vielfältigen Biokatalyse der C-S-Kupplung dar.<sup>[6]</sup>

Um die molekulare Grundlage der Sulfoxid-Synthaseaktivität aufzuklären, wurden Kristallstrukturen von EgtB aus *Mycobacterium thermoresistibile* (EgtB<sub>thermo</sub>) im ternären Komplex mit Eisen und TMH sowie als quaternärer Komplex mit Mangan, N- $\alpha$ -Dimethylhistidin (DMH) und  $\gamma$ GC bestimmt. Das Enzym wurde in *Escherichia coli* produziert und nach Protokollen gereinigt, die bereits für EgtB aus *Mycobacterium smegmatis* (EgtB<sub>smegmatis</sub>) etabliert worden waren.<sup>[1d]</sup> Die Sequenzhomologie der beiden Enzyme beträgt 81 %, sie sind Monomere (Abbildung S1) und zeigen ähnliche In-vitro-Aktivitäten (Tabelle 1). Die rekombinant hergestellten Enzyme wurden als eisenhaltige Holoenzyme aufgereinigt. Ihr Eisengehalt wurde sowohl in einem Ferrozin-basierten kolorimetrischen Test (EgtB<sub>thermo</sub> > 95 %, EgtB<sub>smegmatis</sub> > 50 %, Tabelle S1) als auch durch Titration der EgtB-Aktivität gegen FeSO<sub>4</sub> (Abbildung S2) bestimmt. Ihre In-vitro-Aktivitäten wurden in HEPES-gepufferten Lösungen in Gegenwart von TMH,  $\gamma$ GC, 4  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>, 2 mM Ascorbat, 100 mM NaCl und 2 mM TCEP bei 25 °C gemessen. Die Bildung des Sulfoxids (**3**; Schema 1, Abbildung S3) wurde über Kation-Austausch-HPLC verfolgt.<sup>[1d]</sup> Unter diesen Bedingungen katalysierten

[\*] K. V. Goncharenko,<sup>[1]</sup> F. P. Seebeck  
Departement Chemie, Universität Basel  
St. Johanns-Ring 19, 4056 Basel (Schweiz)  
E-Mail: florian.seebeck@unibas.ch

A. Vit,<sup>[1]</sup> W. Blankenfeldt  
Struktur und Funktion der Proteine  
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung  
Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig (Deutschland)  
E-Mail: wulf.blankenfeldt@helmholtz-hzi.de

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[\*\*] Wir danken der Swiss Light Source (PSI, Villingen, Schweiz) und dem BESSY-II-Synchrotron (HZB, Berlin, Deutschland) sowie dem Europäischen Forschungsrat und der HZI Graduate School for Infection Research für finanzielle Unterstützung. F.P.S. wird durch eine Professur für Molekulare Bionik und einen ERC Starting Grant gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201410045> zu finden.

Tabelle 1: Kinetische Parameter der EgtB-Varianten.<sup>[a]</sup>

Enzym	Donor	Akzeptor	$k_{\text{kat},\text{Donor}}$ [s <sup>-1</sup> ] <sup>[b]</sup>	$k_{\text{kat},\text{Donor}}/K_M$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	$k_{\text{kat},\text{Akzeptor}}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{\text{kat},\text{Akzeptor}}/K_M$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
EgtB <sub>smegmatis</sub>	$\gamma$ GC	TMH	1.1	$1.4 \times 10^4$	1.2	$2.8 \times 10^4$
EgtB <sub>thermo</sub>	$\gamma$ GC	TMH	$8.6 \times 10^{-1}$	$2.0 \times 10^4$	$8.7 \times 10^{-1}$	$2.2 \times 10^4$
EgtB <sub>thermo</sub>	NGC	TMH	$2.5 \times 10^{-1}$	$2.3 \times 10^2$	n.a.	n.a.
EgtB <sub>D416N</sub>	$\gamma$ GC	TMH	$2.7 \times 10^{-1}$	$1.3 \times 10^2$	$1.1 \times 10^{-1}$	$1.9 \times 10^4$
EgtB <sub>D416N</sub>	NGC	TMH	$1.0 \times 10^{-1}$	$1.1 \times 10^3$	n.a.	n.a.

[a]  $\gamma$ GC =  $\gamma$ -Glutamylcystein; TMH = N- $\alpha$ -Trimethylhistidin; NGC = N-Glutarylcytein; die Werte sind gemittelte Werte aus drei unabhängigen Messungen, die Fehler betragen weniger als 15 % der gemittelten Werte. [b]  $k_{\text{kat}}$  und  $k_{\text{kat}}/K_M$  wurden in Gegenwart des Kosubstrats bei einer mindestens dreifach höheren Konzentration als der zugehörige  $K_M$  in luftgesättigten Puffern bestimmt. Michaelis-Menten-Auftragungen sind in den Hintergrundinformationen gezeigt.

EgtB<sub>smegmatis</sub> und EgtB<sub>thermo</sub> bis zu eine Reaktion pro Sekunde und blieben für Hunderte von Reaktionen aktiv (Tabelle 1, Abbildung S3). Ohne Ascorbat verlor EgtB<sub>thermo</sub> nach 120  $\pm$  20 Reaktionen sämtliche Aktivität. Diese konnte aber durch Zugabe von 2 mM Ascorbat wieder hergestellt werden (Abbildung S4). Inkubation mit  $\gamma$ GC allein inaktivierte EgtB<sub>thermo</sub> ebenfalls (Abbildung S4) und induzierte eine Absorptionsbande bei 565 nm ( $\epsilon_{565} = 450 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , Abbildung S5). Diese verschwand ebenfalls durch Zugabe von Ascorbat. Ein ähnliches Absorptionsverhalten wurde auch in Cystein-gebundener Fe<sup>II</sup>-Cystein-Dioxygenase beobachtet und dort als Schwefel-Eisen-Ladungstransferübergang eingeordnet.<sup>[7]</sup> Dagegen traten bei Inkubation von EgtB<sub>thermo</sub> mit TMH oder Puffer allein keine Aktivitäts- oder Absorptionsänderungen auf. Vermutlich wird das in EgtB enthaltene Eisen durch eine  $\gamma$ GC-abhängige Nebenreaktion in einen inaktiven Zustand oxidiert. Die Absorption von inaktivem EgtB<sub>thermo</sub> im Komplex mit  $\gamma$ GC bei 565 nm gibt einen ersten Hinweis darauf, dass das Schwefelatom dieses Liganden direkt am katalytischen Eisenzentrum koordiniert. Dieser Gedanke wird von der folgenden Strukturanalyse gestützt.

EgtB<sub>thermo</sub> wurde als Apoprotein (mthEgtB<sub>apo</sub>), im Komplex mit Eisen und TMH (mthEgtB<sub>TMH</sub>) und im Komplex mit Mangan, DMH und  $\gamma$ GC (mthEgtB<sub>DMH</sub> $\gamma$ GC) kristallisiert. Die Kristalle wurden in Raumgruppe  $P4_32_1$  mit den Zellparametern  $a, b = 135$  und  $c = 141 \text{ \AA}$  indiziert. Die Apostruktur wurde über das anomale Signal der intrinsischen Schwefelatome des Proteins und über das koordinierte Eisen phasiert. Die Phasen wurden mit nativen Daten kombiniert und so eine EgtB<sub>thermo</sub>-Struktur mit einer Auflösung von 1.7  $\text{\AA}$  (apo) erhalten. Ligandenkomplexe von EgtB<sub>thermo</sub> wurden mit einer Auflösung von 1.6  $\text{\AA}$  (TMH) und 1.98  $\text{\AA}$  ( $\gamma$ GC und DMH) bestimmt. In allen Strukturen befinden sich zwei Proteine in der asymmetrischen Einheit, die jedoch nur wenige asymmetrische Kristallkontakte bilden.

Die Elektronendichten der drei EgtB<sub>thermo</sub>-Strukturen zeigen eine kontinuierliche Polypeptidkette von Pro7 zu Asp434 (Abbildung 1). Die Reste 7–150 bilden ein DinB-Helixbündel mit langen Linkern zwischen den Helices 1 und 2 (18 Reste), 2 und 3 (34 Reste) und 3 und 4 (7 Reste). Auf die vierte Helix folgt ein verlängertes zweisträngiges  $\beta$ -Faltblatt (Reste 211–434), das sich um die C-terminale Domäne mit C-Typ-Lectin(CLEC)-Faltung<sup>[8,9]</sup> windet. Diese Faltung ist durch

einen geringen Anteil von Sekundärstrukturelementen charakterisiert. Stattdessen wird sie durch ein dichtes Netz ionischer Wechselwirkungen wie Salzbrücken zwischen Arginin- und Glutamat-Seitenketten (Arg409:Glu196, Arg413:Glu296, Arg397:Glu300, Arg428:Glu360) stabilisiert. Zusätzlich immobilisiert ein Calciumkation im Zentrum der C-terminale sechs Sauerstofflignanden von Seitenketten und dem Peptidrückgrat des Proteins (Met354, 2.8  $\text{\AA}$ ; Gly399, 2.9  $\text{\AA}$ ; Val358, 2.6  $\text{\AA}$ ; Gly356, 2.7  $\text{\AA}$ ; Gln353, 3.6  $\text{\AA}$ ; Glu360, 3.3  $\text{\AA}$ ). Dieses ungewöhnlich schleifenreiche Faltmuster ist erstaunlich konserviert in zwei weiteren Proteinen. Diese umfassen allerdings nur eine Domäne, binden keine Übergangsmetalle und unterscheiden

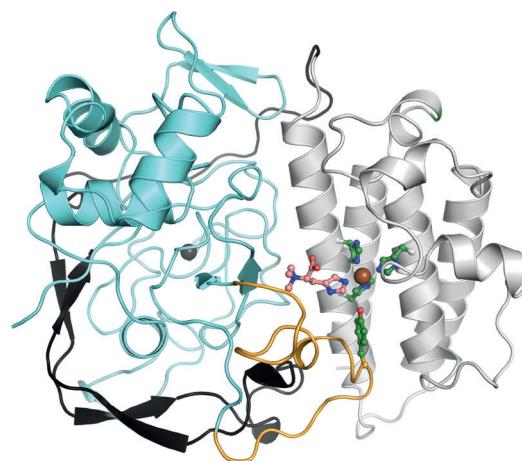


Abbildung 1. EgtB<sub>thermo</sub> im Komplex mit Eisen (braun) und TMH (rosa). Das Protein besteht aus einer N-terminalen DinB-Domäne (grau, Reste 1–150), einer zweisträngigen  $\beta$ -Faltblatt-Region (schwarz, Reste 151–210), und einer C-terminalen C-Typ-Lectin-Domäne (cyan/orange, Reste 211–434). Das aktive Zentrum enthält eine Triade aus drei Histidinen (grün, His51, His134, His138) und wird von der DinB-Domäne und den Resten 370–425 (orange) gebildet.

sich deutlich von EgtB durch Funktionen und Sequenzhomologien von weniger als 30 %.<sup>[8b,9]</sup> Eines dieser strukturell homologen Enzyme (r.m.s.d. = 0.741, Abbildung S6) ist das humane Formylglycin-bildende Enzym (FGE), das die O<sub>2</sub>-abhängige posttranskriptionale Modifikation von Sulfatasen katalysiert.<sup>[8b]</sup> Das zweite Homolog ist das „diversity-generating retroelement variable protein“ TvpA aus *Treponema denticola*.<sup>[9]</sup> Eisen-abhängige Sulfoxid-Synthasen wie EgtB und OvoA müssen aus diesen FGE-ähnlichen Proteinen durch Fusion mit einer N-terminalen DinB-Domäne hervorgegangen sein. Daher ist es nicht überraschend, dass das aktive Zentrum von EgtB durch beide Domänen gebildet wird.

Das aktive Zentrum von EgtB<sub>thermo</sub> befindet sich in einem 15  $\text{\AA}$  tiefen und 10  $\text{\AA}$  breitem Tunnel, der von den Resten 375 bis 425 der CLEC-Domäne, den Helices 2 und 4 und den Schleifen zwischen Helices 1, 2 und 3 gebildet wird. Am Ende dieses Tunnels koordinieren drei Histidine der DinB-

Domäne (Reste 51, 134 und 138) das katalytische Eisenkation (Fe-N: 2.1 Å, 2.1 Å und 2.3 Å). Diese Kristallstruktur revidiert frühere Vorhersagen, nach denen Glu140 und nicht His51 als Ligand fungiert.<sup>[1d,4a]</sup> Rückblickend ist diese Histidintriade in vielen Mitgliedern der DinB-Überfamilie konserviert.<sup>[10]</sup> Mehrere Einzeldomänen-DinB-Proteine wurden als Zink-abhängige Thiol-S-Transferasen oder Maleylpyruvat-Isomerasen identifiziert,<sup>[11]</sup> was darauf hindeutet, dass die metallkatalysierte C-S-Kupplung eine generelle Aktivität von DinB-ähnlichen Proteinen sein könnte.<sup>[11a]</sup> Dennoch unterscheidet sich die von EgtB und OvoA katalysierte O<sub>2</sub>- und Eisen-abhängige C-S-Kupplung wahrscheinlich vom Mechanismus des Zn-katalysierten Alkyltransfers.<sup>[6a,12]</sup> Getragen von diesem Gedanken untersuchten wir als nächstes die Wechselwirkungen zwischen EgtB<sub>thermo</sub> und dessen Substraten.

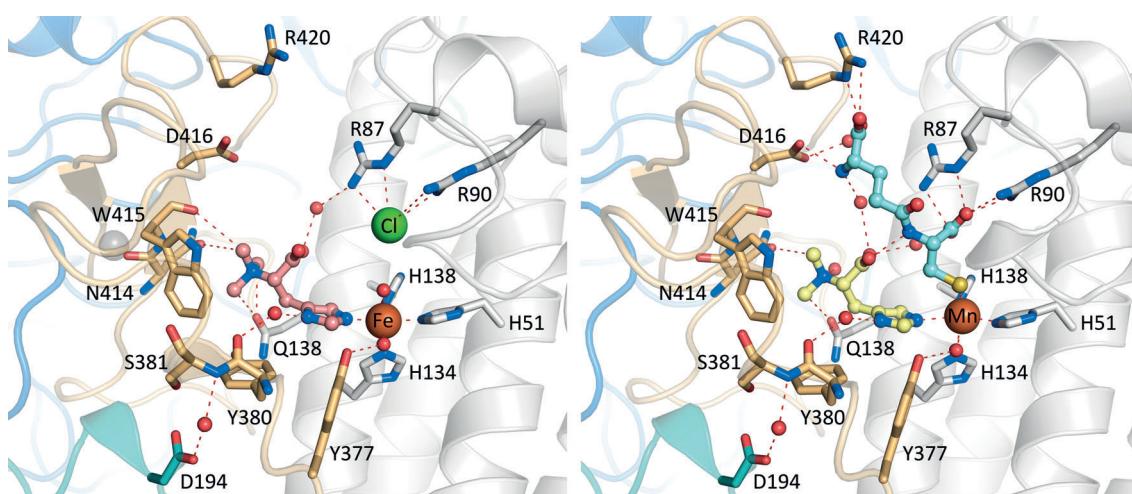
Im ternären Komplex von EgtB<sub>thermo</sub> mit TMH und Eisen bilden der Imidazolring des Substrats (Fe-Nr: 2.2 Å, Abbildung 2) und zwei Wassermoleküle (Fe-O: 2.1 und 2.2 Å) zusammen mit der Histidintriade eine oktaedrische Koordinationssphäre um das Eisenzentrum. Der Imidazolring des Substrats wechselwirkt außerdem über eine H<sub>2</sub>O-vermittelte Wasserstoffbrücke (5.4 Å) mit Tyr380, und die 1-Carboxylat-Gruppe ist ebenfalls über ein verbrückendes Wassermolekül mit der Seitenkette von Arg87 (4.9 Å) in Kontakt. Zwei N-α-Methylgruppen des TMH orientieren sich zur Indol-Seitenkette des Trp415. Die dritte N-α-Methylgruppe scheint einen dipolaren Kontakt zu den Amid-Seitenketten von Gln137 (3.2 Å) und Asn414 (3.5 Å) zu bilden.

Um den Bindungsmodus des zweiten Substrats γGC zu identifizieren, wurde die Struktur des quaternären Komplexes von EgtB<sub>thermo</sub> mit DMH, γGC und Mangan(II) untersucht. Erste Versuche, die eisenhaltigen binären Komplexe mit γGC zu tränken („Soaking“), führten zum Zerfall der Kristalle. Um dieses Problem zu lösen, wurde Mangan-rekonstituiertes EgtB<sub>thermo</sub> genutzt. Dieser Enzymkomplex ist inaktiv,<sup>[1d]</sup> aber die entsprechenden Kristalle tolerierten das „Soaking“ mit DMH und γGC und streuten bis zu einer Auflösung von 1.98 Å (Abbildung 2, Tabellen S2 und S3). In

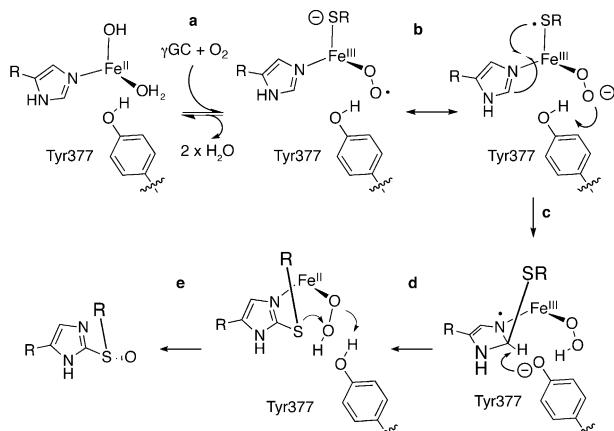
diesem Komplex nehmen die Seitenketten des aktiven Zentrums und DMH sehr ähnliche Positionen wie im ternären Komplex ein (r.m.s.d. = 0.041). Als fünfter Ligand koordiniert γGC an das Metallzentrum (Mn-S: 2.6 Å). Dieser direkte Metall-Thiolat-Kontakt bestätigt den beobachteten Ladungstransfer vom Schwefel auf das Eisen und die dadurch induzierte Absorptionsbande im γGC-Komplex mit eisenhaltigem EgtB<sub>thermo</sub> (Abbildung S5). Die α-Aminogruppe und die Carboxylatgruppen des γGC bilden Salzbrücken zu Asp416 (2.8 Å), Arg420 (2.7 Å), Arg87 (3.0 Å) und Arg90 (2.6 Å). Die Amidfunktion von γGC wechselwirkt über eine Wasserstoffbrücke mit dem 1-Carboxylat von DMH (2.8 Å).

Um zu prüfen, ob die γGC-Bindung im Mangankomplex die Substratbindung im eisenhaltigen und daher aktiven Enzym EgtB<sub>thermo</sub> korrekt widerspiegelt, wurden γGC-bindende Aminosäuren in der Bindetasche durch Mutagenese ausgetauscht. Zu diesem Zweck wurde eine EgtB<sub>thermo</sub>-Variante mit einer Asp416Asn-Mutation (EgtB<sub>D416N</sub>) hergestellt. Diese Mutation erhöht den Wert von  $K_{M,\gamma GC}$  um das 200-fache, hat jedoch keinen signifikanten Einfluss auf  $K_{M,TMH}$  oder  $k_{cat}$ . In einem komplementären Experiment wurden EgtB<sub>thermo</sub> und EgtB<sub>D416N</sub> mit einem γGC-Derivat (*N*-Glutaryl-cystein, NGC), dem die α-Aminofunktion fehlt, kinetisch analysiert. NGC ist ein 100-fach schlechterer Schwefeldonor für EgtB<sub>thermo</sub>, aber ein 10-fach effizienteres Substrat für EgtB<sub>D416N</sub> als γGC. Die im Mangankomplex von EgtB<sub>thermo</sub> beobachtete Salzbrücke zwischen der α-Aminogruppe von γGC und Asp416 ist demnach ebenfalls wichtig für die Substraterkennung während der Katalyse. Der sechste Metall-Ligand im quaternären Komplex ist ein Wassermoleköl (Mn-O: 2.5 Å), das eine Wasserstoffbrücke zur Phenol-Seitenkette von Tyr377 (2.8 Å) bildet. Zusätzlich zeigt diese Koordinationsstelle in Richtung der Öffnung eines engen Tunnels, der das aktive Zentrum mit der Proteinoberfläche verbindet (Abbildung S8). Möglicherweise ermöglicht dieser Tunnel den effizienten Zugang von Sauerstoff zum aktiven Zentrum.

Auf der Grundlage der Beobachtung, dass γGC, TMH und möglicherweise O<sub>2</sub> direkte Liganden des katalytischen Eisenzentrums sind, läuft die EgtB-katalysierte Sulfoxidsyn-



**Abbildung 2.** Aktives Zentrum von EgtB<sub>thermo</sub> im ternären Komplex mit TMH und Eisen (links), oder mit DMH, γGC und Mangan (rechts). Die gebundenen Wassermoleküle sind rot dargestellt. Ein Chloridion (grün) besetzt im ternären Komplex die kationische γGC-Bindestelle. Differenz-elektronendichten der gebundenen Liganden sind in Abbildung S7 dargestellt.



**Schema 2.** Möglicher Mechanismus der EgtB-katalysierten Bildung und Sulfoxidierung der Kohlenstoff-Schwefel-Bindung.

these vermutlich nach folgendem Mechanismus ab (Schema 2):  $\gamma$ GC und  $O_2$  binden an den EgtB-Komplex mit TMH, was in einer Eisen(III)-Superoxo-Spezies resultiert (Schritt a). Diese Spezies hat möglicherweise partiellen Fe<sup>III</sup>-Charakter und komplexiert ein Peroxidanion ( $O_2^-$ ) und ein Thiylradikal (Schritt b). Das Peroxidanion wird durch Protonentransfer von Tyr377 stabilisiert, sodass das Thiylradikal den Imidazolring unter Bildung eines Iminylradikals angreift (Schritt c), der durch Deprotonierung und Ligand-zu-Metall-Elektronentransfer rearomatisiert wird (Schritt d). Die Sulfoxidierung des neuen Thioethers reduziert die Eisen(II)-Peroxospezies zum katalytisch aktiven Ausgangszustand von EgtB (Schritt e).

EgtB repräsentiert eine neue Art von Häm-unabhängigen Eisen-Enzymen, welche die oxidative Bildung und Sulfoxidierung von C-S-Bindungen katalysieren. Die Kristallstruktur von EgtB legt den Grundstein für mechanistische Untersuchungen durch kinetische, spektroskopische und bioinformatische Methoden,<sup>[13]</sup> und eröffnet Möglichkeiten des Protein-Engineerings, sodass Schwefel-Transferasen maßgeschneidert werden können. Dies wird dadurch verdeutlicht, dass eine einzelne Mutation (an Asp416) genügt, um die Schwefeldeondorspezifität von EgtB<sub>thermo</sub> von  $\gamma$ GC zu NGC um das fast 1000-fache zu ändern. Die hier präsentierte erste Struktur einer Sulfoxid-Synthase wird auch die mechanistischen Untersuchungen am Ovothiol-Biosyntheseenzym OvoA unterstützen.<sup>[4]</sup>

Eingegangen am 13. Oktober 2014  
Online veröffentlicht am 16. Januar 2015

**Stichwörter:** Enzymkatalyse · Ergothionein ·  
Nicht-Häm-Eisen-Enzyme · Ovothiol · Schwefeltransfer

[1] a) D. B. Melville, W. H. Horner, C. C. Otken, M. L. Ludwig, *J. Biol. Chem.* **1955**, 213, 61–68; b) D. B. Melville, D. S. Genghof,

E. Inamine, V. Kovalenko, *J. Biol. Chem.* **1956**, 223, 9–17; c) I. K. Cheah, B. Halliwell, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2012**, 1822, 784–793; d) F. P. Seebeck, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 6632–6633.

- [2] a) B. D. Paul, S. H. Snyder, *Cell Death Differ.* **2009**, 47, S149–S149; b) T. Pluskal, M. Ueno, M. Yanagida, *PLoS One* **2014**, 9, e97774; c) I. K. Cheah, R. L. Ong, J. Gruber, T. S. Yew, L. F. Ng, C. B. Chen, B. Halliwell, *Free Radical Res.* **2014**, 47, 1036–1045; d) M. H. Bello, V. Barrera-Perez, D. Morin, L. Epstein, *Fungal Genet. Biol.* **2012**, 49, 160–172; e) S. C. Emani, M. J. Williams, I. J. Wiid, N. F. Hiten, A. J. Viljoen, R. D. Pietersen, P. D. van Helden, B. Baker, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, 57, 3202–3207.
- [3] A. Vit, L. E. Misson, W. Blankenfeldt, F. P. Seebeck, *Acta Crystallogr. Sect. F* **2014**, 70, 676–680.
- [4] a) A. Braunschäusen, F. P. Seebeck, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 1757–1759; b) H. Song, A. S. Her, F. Raso, Z. Zheng, Y. Huo, P. Liu, *Org. Lett.* **2014**, 16, 2122–2125; c) H. Song, M. Leninger, N. Lee, P. Liu, *Org. Lett.* **2013**, 15, 4854–4857; d) G. T. Mashabela, F. P. Seebeck, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 7714–7716.
- [5] a) C. A. Joseph, M. J. Maroney, *Chem. Commun.* **2007**, 3338–3349; b) P. L. Roach, I. J. Clifton, V. Fulop, K. Harlos, G. J. Barton, J. Hajdu, I. Andersson, C. J. Schofield, J. E. Baldwin, *Nature* **1995**, 375, 700–704.
- [6] a) B. Li, J. P. Yu, J. S. Brunzelle, G. N. Moll, W. A. van der Donk, S. K. Nair, *Science* **2006**, 311, 1464–1467; b) E. Sasaki, X. Zhang, H. G. Sun, M. Y. Lu, M. Y. Liu, T. L. Liu, A. Ou, J. Y. Li, Y. H. Chen, S. E. Ealick, H. W. Liu, *Nature* **2014**, 510, 427–431; c) A. Chatterjee, N. D. Abeydeera, S. Bale, P.-J. Pai, P. C. Dorrestein, D. H. Russell, S. E. Ealick, T. P. Begley, *Nature* **2011**, 478, 542–U146; d) F. Berkovitch, Y. Nicolet, J. T. Wan, J. T. Jarrett, C. L. Drennan, *Science* **2004**, 303, 76–79; e) P. L. Roach, I. J. Clifton, C. M. Hensgens, N. Shibata, C. J. Schofield, J. Hajdu, J. E. Baldwin, *Nature* **1997**, 387, 827–830; f) D. H. Scharft, P. Chankhamjon, K. Scherlach, T. Heinekamp, K. Willing, A. A. Brakhage, C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 11092–11095; *Angew. Chem.* **2013**, 125, 11298–11301.
- [7] J. D. Gardner, B. S. Pierce, B. G. Fox, T. C. Brunold, *Biochemistry* **2010**, 49, 6033–6041.
- [8] a) S. A. McMahon, J. L. Miller, J. A. Lawton, D. E. Kerkow, A. Hodges, M. A. Marti-Renom, S. Doulatov, E. Narayanan, A. Sali, J. F. Miller, P. Ghosh, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, 12, 886–892; b) T. Dierks, A. Dickmanns, A. Preusser-Kunze, B. Schmidt, M. Mariappan, K. von Figura, R. Ficner, M. G. Rudolph, *Cell* **2005**, 121, 541–552.
- [9] J. Le Coq, P. Ghosh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 14649–14653.
- [10] a) K. Nagata, J. Ohtsuka, M. Takahashi, A. Asano, H. Iiino, A. Ebihara, M. Tanokura, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2008**, 70, 1103–1107; b) S. S. Rajan, X. Yang, L. Shuzvalova, F. Collart, W. F. Anderson, *Biochemistry* **2004**, 43, 15472–15479; c) D. R. Cooper, K. Grelewski, C.-Y. Kim, A. Joachimiak, Z. S. Derewenda, *Acta Crystallogr. Sect. F* **2010**, 66, 219–224.
- [11] a) G. L. Newton, S. S. Leung, J. L. Wakabayashi, M. Rawat, R. C. Fahey, *Biochemistry* **2011**, 50, 10751–10760; b) J. Feng, Y. Che, J. Milse, L. Yin, C. Rückert, X. H. Shen, S. W. Qi, J. Kalinowski, S. J. Liu, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 10778–10785; c) T. T. Liu, N. Y. Zhou, *J. Bacteriol.* **2012**, 194, 3987–3994.
- [12] J. Penner-Hahn, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, 11, 166–171.
- [13] E. A. Bushnell, G. B. Fortowsky, J. W. Gauld, *Inorg. Chem.* **2012**, 51, 13351–13356.