

Strukturelle Einblicke in den Mo-Cofaktor-Einbau in Sulfitoxidase durch ortsspezifische Spinmarkierung

Aaron Hahn, Christopher Engelhard, Stefan Reschke, Christian Teutloff, Robert Bittl,
Silke Leimkühler und Thomas Risse*

Abstract: Einkernige Molybdoenzyme katalysieren eine Vielzahl von Redoxreaktionen und sind in allen Reichen des Lebens hoch konserviert. Dieser Artikel beschäftigt sich mit der Frage, wie der Molybdän-Cofaktor (Moco) in die Apoform humaner Sulfitoxidase (hSO) eingebaut wird. Hierbei wird ortsspezifische Spinmarkierung genutzt, um intramolekulare Abstände im Nanometerbereich zu bestimmen. In vergleichenden Messungen an Holo- und Apoformen verschiedener Varianten von hSO wurden Strukturunterschiede festgestellt, die auf eine kurze Schleife (Reste 263–273) in der Moco-Domäne beschränkt sind. Eine Klappbewegung dieser Schleife ermöglicht den Zugang zur Moco-Bindungstasche in der Apoform und liefert eine mögliche Erklärung für die zuvor beobachtete *In-vitro*-Rekonstitution von Apo-hSO mit Moco. Ein solches Bindungsmotiv kann in strukturell verwandten Molybdoenzymen in einer Reihe verschiedener Organismen identifiziert werden, was auf einen gemeinsamen Mechanismus zum Moco-Einbau schließen lässt.

Molybdoenzyme erfüllen wesentliche Funktionen in vielen verschiedenen Aspekten des zellulären Stoffwechsels.^[1] Diese Enzyme sind evolutionär stark konserviert und haben einen Molybdän-Cofaktor (Moco) gemeinsam. Humane SO (hSO), die im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert ist, katalysiert die Oxidation von Sulfit zu Sulfat, den letzten Schritt im oxidativen Abbau schwefelhaltiger Aminosäuren an seinem redoxaktiven Cofaktor (Moco). Sulfit ist ein starkes Nukleophil und kann als solches viele verschiedene Zellkomponenten schädigen, unter anderem Membranbestandteile und Sulfolipide.^[1c] Fehlt SO, akkumuliert Sulfit im Organismus und bewirkt besonders im Gehirn schwerwiegende Schädigungen. Die entsprechenden Krankheiten, isolierte Sulfitoxidase-Defizienz^[2] oder Moco-Defizienz^[3] sind

von sehr schnell verlaufender Neurodegeneration charakterisiert^[4] und haben einen Tod in früher Kindheit zur Folge.

In der Vergangenheit waren Molybdoenzyme Gegenstand intensiver Forschung, um unter anderem die Biosynthese,^[5] die zelluläre Verteilung^[6] und die Redoxchemie von Moco^[7] aufzuklären. Dennoch sind elementare Fragen wie die strukturellen Konsequenzen des Moco-Insertionsmechanismus in hSO nach wie vor ungeklärt. Da hSO im Intermembranraum von Mitochondrien lokalisiert ist, stellen die Translokation, die Faltung und der Cofaktor-Einbau in hSO einen komplexen, mehrstufigen Reifungsprozess dar, der stark reguliert ist.^[8] Aufgrund seiner Instabilität wird es als unwahrscheinlich angesehen, dass Moco in freier, nicht proteingebundener Form in der Zelle existiert. Allerdings konnten bislang noch keine Chaperone für Enzyme der Sulfitoxidase-Familie identifiziert werden. Daher existiert eine Reihe von unbestätigten Hypothesen für den Einbau von Moco in hSO.^[1c,9] Biochemische Arbeiten an SO und anderen Molybdoenzymen schlagen vor, dass Moco als letzter Cofaktor in größtenteils gefaltetes Apoenzym eingebaut wird.^[10] Diese Beobachtung erlaubt es, die strukturellen Details des Insertionsschritts durch einen Vergleich von Apo- und Holoform zu untersuchen.

Diese Arbeit hat sich die Aufklärung der strukturellen Ursachen des Moco-Einbaumechanismus in hSO zum Ziel gesetzt. Zu diesem Zweck soll ortsspezifische Spinmarkierung („site-directed spin labeling“, SDSL) eingesetzt werden. Humane SO ist ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von etwa 110 kDa. Jedes Monomer des Vollängenproteins besteht aus drei Domänen, die als Moco-, Häm-bindende und Dimerisierungsdomäne bezeichnet werden. Die Struktur von hSO wurde noch nicht bestimmt, allerdings konnte die Kristallstruktur von stark homologer SO aus Hühnerleber (cSO)^[11] (pdb: 1SOX, 67% identische Reste)^[12] gelöst werden. Ausgehend von der Struktur von cSO wurden geeignete Positionen zur Detektion von Strukturänderungen in der Moco-Domäne ausgewählt. Zwischen Paaren von ortsspezifisch eingeführten Spinmarkern der jeweiligen Holo- und Apoproteinformen wurden Abstandsverteilungen mittels gepulster Elektron-Elektron-Doppelresonanzspektroskopie (PELDOR, auch: DEER) bestimmt und so nach Strukturunterschieden in Abwesenheit des Moco gesucht.^[13] Die Ergebnisse zeigen die stark lokalisierte Änderung einer kurzen Schleife (Reste 263–273 in hSO) in der Moco-Domäne. Die beobachtete Klappbewegung der Schleife ermöglicht den Zugang zur Moco-Bindungstasche von der Proteinoberfläche in der Apoform, während dieser in der Holoform blockiert ist. Die Konservierung dieser Schleifenstruktur und des Moco-Bindungsmotivs in einer Vielzahl von Molybdoenzymen

[*] Dr. A. Hahn, Prof. Dr. T. Risse

Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin
Takustraße 3, 14195 Berlin (Deutschland)
E-Mail: risse@chemie.fu-berlin.de

C. Engelhard, Dr. C. Teutloff, Prof. Dr. R. Bittl
Fachbereich Physik, Freie Universität Berlin
Arnimallee 14, 14195 Berlin (Deutschland)

Dr. S. Reschke, Prof. Dr. S. Leimkühler
Institut für Biochemie und Biologie, Universität Potsdam
Karl-Liebknecht-Straße 24–25, 14476 Golm (Deutschland)
Dr. C. Teutloff, Prof. Dr. R. Bittl, Prof. Dr. T. Risse
Berlin Joint EPR Laboratory Freie Universität Berlin (Deutschland)

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201504772> zu finden.

(siehe Abbildung S12) deuten auf einen konservierten Mechanismus zum Moco-Einbau hin.

SDSL basiert üblicherweise auf der Markierung von Cysteinresten, was ein cysteinfreies Konstrukt erfordert, um das Auftreten eines Hintergrundsignals, verursacht durch natives Cystein, zu vermeiden. Dem cysteinfreien Konstrukt, das in dieser Arbeit genutzt wurde, fehlte die Häm-Domäne von hSO, weswegen es im Folgenden als HSOMD (hSO-Moco-Domäne) bezeichnet wird. HSOMD zeigt auch nach Austausch der vier nichtessentiellen Cysteine Enzymaktivität.^[14] Außerdem wurden in allen hier untersuchten Konstrukten, die ortsspezifisch eingebrachte Cysteine (an den Positionen 195, 235, 302, 217, 267, 341 und 353) enthielten, 70–90% der Wildtyp-Aktivität bezüglich der Oxidation von Sulfit bestimmt, wenn der essenzielle Cysteinrest 207 ebenfalls enthalten war. Austausch von C207 gegen Serin resultierte in einem inaktiven Enzym,^[15] weil hier die Cystein-Schwefel-Molybdän-Bindung fehlt. Trotz fehlender Aktivität wiesen alle Holo-SOMD-Varianten, denen das essenzielle C207 fehlte, in Untersuchungen mit ICP/OES (optische Emissionsspektrometrie mittels induktiv gekoppelten Plasmas) eine Molybdänbeladung von 80 % auf, was dem Mo-Einbaugrad in Wildtyp-SO entspricht.

Um die Vergleichbarkeit des cysteinfreien hSOMD-Konstruktes mit dem Vollängen-Wildtyp-Protein (hSO) sicherzustellen, wurden mit N195^[*] (α -Helix), R235 (β -Faltblatt) und R302 (Schleife) drei Positionen ausgewählt, die sich auf verschiedenen Sekundärstrukturelementen in der Umgebung der Moco-Bindungstasche befinden. Als Grundlage dazu diente die cSO-Kristallstruktur (Abbildung 1). Um

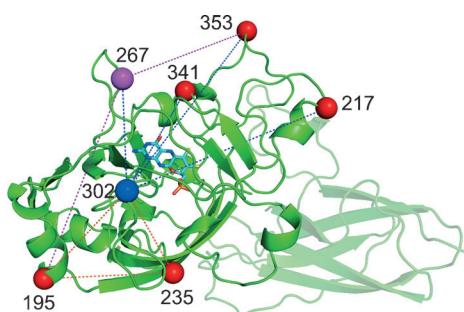


Abbildung 1. Ausgewählte Positionen zur Spinmarkierung (Struktur von cSO; pdb: 1SOX). Die Nummerierung entspricht den jeweiligen Positionen in hSO (siehe Sequenz-Alignment in den Hintergrundinformationen).

nun Vollängen-SO mithilfe von SDSL zu untersuchen, wurden Paare der nichtnatürlichen Aminosäure *p*-Acetyl-phenylalanin (N195/R235pAcPhe, N195/R302pAcPhe und R235/R302pAcPhe) in das Wildtyp-Enzym eingebracht. Die Spinmarkierung dieser Varianten erfolgte durch eine spezifische katalysierte Ketoxim-Kupplung.^[16] Abstandsverteilungen, die durch DEER-Experimente an hSO ermittelt wurden,

[*] Die Nummerierung bezieht sich auf hSO. Das Sequenz-Alignment zwischen hSO und cSO ist in den Hintergrundinformationen zu finden.

wurden mit Simulationen auf der Grundlage der cSO-Kristallstruktur verglichen. Dazu wurde das PyMOL-Skript „MtsslWizard“^[17] genutzt, das den Konformationsraum verschiedener Spinmarker unter Berücksichtigung eines einfachen Van-der-Waals-Modells berechnen kann. Für alle Messungen stimmten die mit der Software „DeerAnalysis2013“^[18] bestimmten Abstandsverteilungen gut mit den Erwartungen auf Grundlage der cSO-Kristallstruktur überein (Abbildung S2). Dies ist auch für hSOMD-Varianten der Fall, die nur die mit MTSSL-spinmarkierten Cystein an den gleichen Positionen enthalten. Die Abstandsverteilungen enthalten dabei Beiträge von Spin-Spin-Wechselwirkungen innerhalb eines Monomers (intra) und zwischen zwei Monomer-Einheiten (inter) des Homodimers. Die Simulationen erlauben eine Unterscheidung zwischen diesen Beiträgen, wobei simulierte Intra-Monomer-Abstände in blau und simulierte Inter-Monomer-Abstände in grün dargestellt sind. Inter-Monomer-Abstände waren in den meisten Fällen zu groß, um in den DEER-Experimenten exakt bestimmt zu werden, weshalb die Diskussion und die Analyse der Abstandsverteilungen auf die Intra-Monomer-Abstände beschränkt wurden. HSOMD, dem C207 fehlt, und das Vollängenprotein sind folglich strukturell nicht von cSO in der untersuchten Region zu unterscheiden. Daher kann das cysteinfreie Konstrukt hSOMD (C207S) als Grundlage zur Untersuchung des Apoproteins verwendet werden. Dabei ist zu beachten, dass die Ketoxim-Kupplung von Spinmarkern an Apoprotein-Varianten, die die nichtnatürliche Aminosäure enthielten, aufgrund der unzureichenden Stabilität des Apoproteins bei den zu verwendenden Reaktionsbedingungen nicht möglich war.

Die Messungen der Apoformen der hSOMD-Varianten N195C/R235C, N195/R302C and R235/R302C zeigten keine Veränderungen im Vergleich zu den Simulationen basierend auf der cSO-Kristallstruktur (siehe Abbildung S3). Hier wurden die Abstandsverteilungen aller Cystein-Varianten sowohl mithilfe von „MtsslWizard“ als auch mit der Matlab-Anwendung „MMM2013“ berechnet, wobei beide sehr ähnliche Resultate liefern. Daher wird konstatiert, dass die untersuchte Region in Abwesenheit des Cofaktors unverändert bleibt.

In einem nächsten Schritt wurden die restlichen verbleibenden Sekundärstrukturelemente der Moco-Domäne untersucht. Zu diesem Zweck wurden verschiedene MTSSL-markierte Cysteinpaare erzeugt, die alle den Rest 302 als Fixpunkt und zusätzlich die Positionen 217, 267, 341 und 353 enthielten. Zusätzlich wurden zwei Paare, die Rest 267 mit den Resten 195 und 353 enthielten, hergestellt. All diese Paare zeigten in den Simulationen Abstände im für DEER zugänglichen Bereich von 15–60 Å.^[13] Für alle Paare wurden Abstandsverteilungen für Holo- und Apoprotein bestimmt. In Fällen, in denen die Zeitspuren Modulationstiefen um 0.5 aufwiesen (z.B. die Holoform der Variante 195/267C, Abbildung S5), müssen Multispineffekte in Betracht gezogen werden, die zu artifiziellen Beiträgen in den Abstandsverteilungen („ghost-peaks“) führen können. Die Analyse der Daten mithilfe des „Power-scaling“-Ansatzes,^[19] der in „DeerAnalysis2013“ implementiert ist, lieferte keine Anzeichen für solche „ghost-peaks“. Die Messungen der Paare 302–217, 302–341 und 302–353 zeigten keine signifikanten Un-

terschiede zwischen Holo- und Apoprotein-Proben. Dies ist exemplarisch für letzteres in Abbildung 2 A gezeigt (DEER-Zeitspur, siehe Abbildung S4). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse kann gefolgert werden, dass die Struktur des untersuchten Bereichs unverändert ist, wenn der Cofaktor nicht vorhanden ist. Ein anderes Bild stellt sich für Paare dar, die den Rest 267C enthalten.

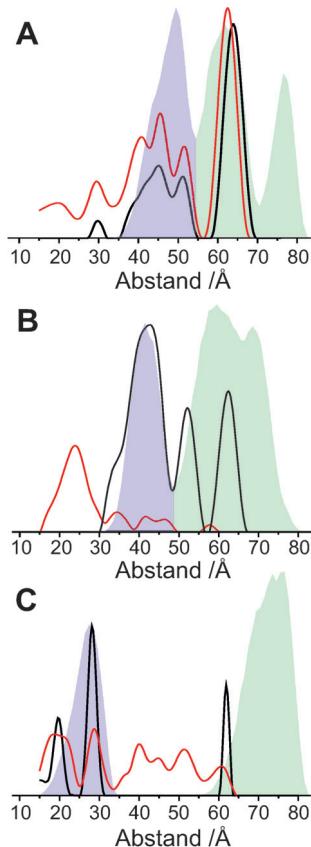


Abbildung 2. Abstandsverteilungen für Holo- (schwarz) und Apoprotein-Proben (rot), die Cysteinpaare enthalten an den Positionen: A) 302–353; B) 195–267 und C) 267–302. Farbige Flächen stellen Simulationen basierend auf der Kristallstruktur von cSO dar (pdb: 1SOX), die mit dem PyMOL-Skript „Mtssl Wizard“ durchgeführt wurden; Simulationen mithilfe des MMM-Softwarepaket sind in Abbildung S8 gezeigt. Blau: Intra-Monomer-Abstände; grün: Inter-Monomer-Abstände.

Wenn etwa die Abstandsverteilungen von Apo- und Holoprotein des Paares 195–267C in Abbildung 2B verglichen werden, tritt für die Apoform neben schwächeren Beiträgen zwischen 30 und 50 Å ein neuer Peak bei kleineren Abständen auf. Dieser Beitrag ist bereits in der Zeitspur der Apoform zu erkennen, in der eine deutlich schnellere anfängliche Abnahme der Echointensität festzustellen ist, die kleineren Abständen zugeordnet werden kann. Während der Inter-Spin-Abstand zwischen den Resten 195 und 267 in der Apoform reduziert ist, werden für 267–302 (Abbildung 2C) größere Abstände detektiert. In Kombination mit der Beobachtung, dass die Abstandsverteilungen für alle anderen untersuchten Paare nahezu unverändert sind, wird gefolgert, dass

die Schleife, die den Rest 267 enthält, eine Moco-abhängige Strukturumlagerung erfährt. Hier muss angemerkt werden, dass die Abstandsverteilung für das Paar 267–353 im Vergleich zu den Simulationen basierend auf der cSO-Kristallstruktur bereits für die Holoform verbreitert ist. Diese Beobachtung bestätigt röntgenkristallographische Untersuchungen an einer Variante, der das essenzielle Cystein fehlt, in denen für die Schleife, in der Position 353 positioniert ist, fehlende Elektronendichte festgestellt wurde. Dies deutet auf eine erhöhte Mobilität dieses Strukturelements hin (pdb: 3HBG).^[20]

Die strukturellen Randbedingungen, die aus den Abstandsverteilungen ermittelt wurden, wurden genutzt, um die Bewegung der Schleife, in der Position 267 liegt, zu beschreiben. Die durch DEER ermittelten Daten wurden für die Berechnung eines Strukturmodells für das Apoprotein mithilfe des „Elastic Network Model“(ENM)-Moduls der Software „MMM2013.2“^[21] verwendet.

Die für das Holoprotein bestimmten Abstandsverteilungen stimmen gut mit den Simulationen anhand der cSO-Kristallstruktur (pdb: 1SOX) überein. Daher wurde diese Struktur (ohne die Häm-Domäne) als Ausgangspunkt für den Strukturübergang genutzt. Die Abstandsinformationen (mittlerer gewichteter Abstand und Breite der Verteilung, siehe Tabelle 1) aus allen Cysteinpaaren des Apoproteins wurden genutzt, um die in Abbildung 3A dargestellte

Tabelle 1: Abstandsinformationen für die Berechnung des Strukturmodells für das Apoprotein durch den ENM-Ansatz aus den DEER-Abstandsverteilungen.

Markierte Positionen	Gewichteter mittlerer Abstand [Å]	Breite der Verteilung [Å]
195/235	25.7	17.2
195/302	26.9	17.1
235/302	25.8	22.2
217/302	40.9	15.0
302/341	36.3	19.7
267/302	34.0	41.3
302/353	39.0	37.0
195/267	27.0	34.3
267/353	28.8	31.2

Struktur (orange) zu berechnen, die im Vergleich zur Kristallstruktur (blau) dargestellt ist. Die mittlere quadratische Abweichung der optimierten Struktur beträgt 1.6 Å, ein Wert, der eine gute Übereinstimmung dokumentiert.^[21a]

Die Überlagerung beider Modelle offenbart eine ausgeprägte Bewegung der Schleife, die den Rest 267 beinhaltet (rote Kugeln). Eine geringere Abweichung kann auch für die Schleife, die den Rest 353 enthält (gelbe Kugeln), beobachtet werden, während für die weiteren in die Messungen involvierten Reste (graue Kugeln) keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Für die Bewegung der Schleife, die Rest 353 enthält, ist, wie bereits diskutiert, von Strukturunterschieden, die durch den Austausch C207S verursacht wurden, auszugehen.^[20]

Die Analyse der DEER-Experimente an den SO-Apoprotein-Proben mithilfe des ENM-Ansatzes offenbart in

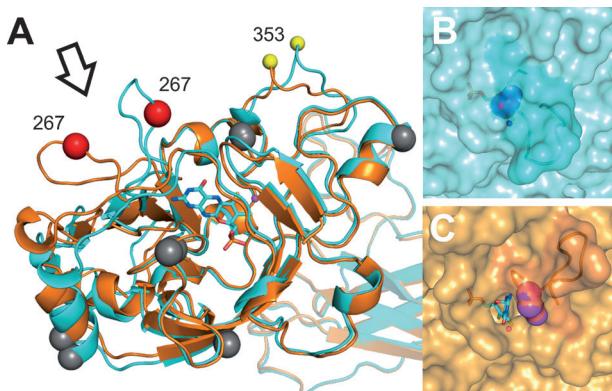


Abbildung 3. A) Strukturmodell für die Apoform (orange) von hSO-MDMD berechnet mithilfe des ENM-Ansatzes. Blau: Holoform von cSO (PDB: 1SOX), die als Referenzstruktur genutzt wurde. Die Dimerisierungsdomäne ist transparent dargestellt. B und C) Ausschnitt der Connolly-Oberfläche, der die Schleife 263–273 für die hSO-Strukturen in (A) zeigt, wo die Darstellungsrichtung durch den Pfeil angedeutet ist. B) Holoprotein-Struktur; die Oberfläche der Schleifenregion und das Proteinrückgrat der Schleife sind hervorgehoben. Seitenkettenatome des Restes D265 sind als blaue/magentaarbene Kugeln dargestellt; MoCo ist als Stabmodell gezeigt. C) Strukturmodell für das Apoprotein; zur besseren Darstellung des Zugangs zur MoCo-Bindungstasche wurde der Cofaktor in der Struktur der Apoform als Stabmodell belassen; die Oberfläche der Schleifenregion sowie das Proteinrückgrat der Schleife sind hervorgehoben. Seitenkettenatome des Restes D265 sind als orange-/magentaarbene Kugeln dargestellt.

Abwesenheit des Cofaktors eine Klappbewegung einer kurzen Schleife, die aus den Resten 263–273 besteht, während der Rest des Proteins nahezu unverändert bleibt. Dies stellt den ersten experimentellen Nachweis für eine Strukturänderung zwischen Holo- und Apo-hSO dar und bestätigt eine Hypothese von Hille et al., die die Bewegung eines Sekundärstrukturelements als Teil des MoCo-Einbaumechanismus für *Arabidopsis thaliana* vorschlugen.^[1a] An dieser Stelle sollte darauf hingewiesen werden, dass diese stark lokalisierte Strukturänderung verschieden ist von anderen bekannten Protein-Cofaktor-Wechselwirkungen, die typischerweise in umfassenden, weitreichenden Effekten bei Cofaktor-Bindung (oder Entfernung) resultiert.^[22] Ein Vergleich der Connolly-Oberfläche^[23] von Holo- und Apoprotein ist in den Abbildungen 3B bzw. C gezeigt. Es wird deutlich, dass die Klappbewegung der Schleife in der Apoform den direkten Zugang zur MoCo-Bindungstasche von der Oberfläche aus ermöglicht, während dieser Zugang in der Holoform von der Schleife (Reste 263–273) blockiert wird. Diese Konformation der Schleife wird durch zwei Wasserstoffbrücken zwischen der Seitenkette von D265 und der N1-Ringposition bzw. der 2-Aminogruppe des MoCo stabilisiert (Abbildung 3B).^[11]

Diese Analyse kann keine Informationen bezüglich der Konformation der Schleife selbst liefern; deren Details sind abhängig von der genauen Wahl der Simulationsparameter. Allerdings zeigten alle durchgeführten Rechnungen eine Bewegung der Schleife in der Art, dass die MoCo-Bindungstasche von der Proteinoberfläche zugänglich wird (siehe die Hintergrundinformationen für eine detailliertere Diskussion). Diese Erkenntnis liefert eine mögliche Erklärung für die In-vitro-Rekonstitution von hSO durch MoCo ohne die

Zugabe weiterer Proteine.^[24] Jedoch ist es vorstellbar, dass der Einbauprozess *in vivo* weitere Komponenten beinhaltet, um die Biosynthese des Enzyms zu optimieren. Dies wurde bereits für prokaryotische Molybdoenzyme beobachtet, die über spezifische Chaperone verfügen.^[25]

Wie bereits angesprochen, spielt der Rest D265 eine wichtige Rolle für die MoCo-Bindung. Ist das Holoprotein gebildet, blockiert er den Kanal und hält die Schleife und MoCo in einer definierten Konformation. Ein Vergleich mit anderen Proteinen der Sulfitoxidase-Familie zeigt bemerkenswerte Ähnlichkeiten bezüglich dieses Bindungsmotivs: Analoge Schleifenstrukturen mit vergleichbarer MoCo-Koordination können z.B. in Sulfitdehydrogenase aus *Starkeya novella* (Reste 157–167, PDB: 2BPB) oder *Escherichia coli* YedY (Reste 43–52, PDB: 1XDQ) gefunden werden (Strukturmodelle und weitere Beispiele sind in Abbildung S12 dargestellt). In Anbetracht der Erkenntnisse für hSO in dieser Arbeit ist von einem ähnlichen Mechanismus des MoCo-Einbaus auszugehen, der die Klappbewegung einer konservierten Schleifenstruktur in einer Vielzahl unterschiedlicher Organismen beinhaltet.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass Strukturunterschiede zwischen Apo- und Holoform von hSO auf eine kurze Schleifenregion aus den Resten 263–273 beschränkt sind. Eine Klappbewegung der Schleife liefert eine strukturelle Erklärung für die zuvor beobachtete Möglichkeit, MoCo *in vitro* in Apo-Sulfitoxidase einzubringen. Die Konservierung dieses Strukturmotivs in Kombination mit der konservierten Wechselwirkung analoger Reste mit MoCo in verschiedenen einkernigen Molybdoenzymen lässt darauf schließen, dass die in hSO beobachteten Strukturänderungen sowie der vorgeschlagene Einbaumechanismus auch für andere homologe Proteine dieser Familie zutrifft.

Danksagung

Wir danken dem „Center of Excellence 314“ (UniCat), finanziert von der DFG, für finanzielle Unterstützung. A.H. dankt der Studienstiftung des deutschen Volkes für ein Stipendium. Wir danken K. V. Rajagopalan (Duke University) für die Bereitstellung der Plasmide zur hSO- und hSO-MDMD-Expression sowie Ricarda Ebert für ihre Hilfe zu Beginn des Projekts und Gregor Hagelüken für die Erweiterung des PyMOL-Skripts „MtsslWizard“ um die spinmarkierte Version der nichtnatürlichen Aminosäure *p*-Acetylphenylalanin. Molekularbiologische Arbeiten wurden im Bereich Genetische Biophysik des Fachbereichs Physik der FU Berlin durchgeführt.

Stichwörter: Biokatalyse · Cofaktoren · Proteinstrukturen

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 11865–11869
Angew. Chem. **2015**, *127*, 12033–12037

[1] a) R. Hille, J. Hall, P. Basu, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 3963–4038;
b) G. Schwarz, R. R. Mendel, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2006**, *57*, 623–647; c) G. Schwarz, R. R. Mendel, M. W. Ribbe, *Nature* **2009**, *460*, 839–847.

- [2] S. H. Mudd, F. Irreverre, L. Laster, *Science* **1967**, *156*, 1599–1602.
- [3] J. L. Johnson, W. R. Waud, K. V. Rajagopalan, M. Duran, F. A. Beemer, S. K. Wadman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 3715–3719.
- [4] V. E. Shih, I. F. Abroms, J. L. Johnson, M. Carney, R. Mandell, R. M. Robb, J. P. Cloherty, K. V. Rajagopalan, *N. Engl. J. Med.* **1977**, *297*, 1022–1028.
- [5] a) J. Kuper, A. Llamas, H. J. Hecht, R. R. Mendel, G. Schwarz, *Nature* **2004**, *430*, 803–806; b) B. M. Hover, A. Loksztejn, A. A. Ribeiro, K. Yokoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7019–7032.
- [6] J. Teschner, N. Lachmann, J. Schulze, M. Geisler, K. Selbach, J. Santamaria-Araujo, J. Balk, R. R. Mendel, F. Bittner, *Plant Cell* **2010**, *22*, 468–480.
- [7] a) M. Kaupp, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 546–549; *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 554–558; b) R. A. Rothery, B. Stein, M. Solomonson, M. L. Kirk, J. H. Weiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 14773–14778.
- [8] J. M. Klein, G. Schwarz, *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 4876–4885.
- [9] T. Kruse, C. Gehl, M. Geisler, M. Lehrke, P. Ringel, S. Hallier, R. Hansch, R. R. Mendel, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 6623–6635.
- [10] C. Iobbi-Nivol, S. Leimkühler, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2013**, *1827*, 1086–1101.
- [11] C. Kisker, H. Schindelin, A. Pacheco, W. A. Wehbi, R. M. Garrett, K. V. Rajagopalan, J. H. Enemark, D. C. Rees, *Cell* **1997**, *91*, 973–983.
- [12] R. M. Garrett, D. B. Bellissimo, K. V. Rajagopalan, *Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expression* **1995**, *1262*, 147–149.
- [13] G. Jeschke, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2012**, *63*, 419–446.
- [14] a) C. A. Temple, T. N. Graf, K. V. Rajagopalan, *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *383*, 281–287; b) H. J. Cohen, S. Betcher-Lange, D. L. Kessler, K. V. Rajagopalan, *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 7759–7766; c) S. Reschke, D. Niks, H. Wilson, K. G. Sigfridsson, M. Haumann, K. V. Rajagopalan, R. Hille, S. Leimkühler, *Biochemistry* **2013**, *52*, 8295–8303.
- [15] a) R. M. Garrett, K. V. Rajagopalan, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 7387–7391; b) G. N. George, R. M. Garrett, R. C. Prince, K. V. Rajagopalan, *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 8456–8460.
- [16] a) M. R. Fleissner, E. M. Brustad, T. Kalai, C. Altenbach, D. Cascio, F. B. Peters, K. Hideg, S. Peuker, P. G. Schultz, W. L. Hubbell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 21637–21642; b) A. Hahn, S. Reschke, S. Leimkühler, T. Risse, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 7077–7084; c) C. C. Liu, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 413–444.
- [17] G. Hagelueken, R. Ward, J. H. Naismith, O. Schiemann, *Appl. Magn. Reson.* **2012**, *42*, 377–391.
- [18] G. Jeschke, V. Chechik, P. Ionita, A. Godt, H. Zimmermann, J. Banham, C. R. Timmel, D. Hilger, H. Jung, *Appl. Magn. Reson.* **2006**, *30*, 473–498.
- [19] T. von Hagens, Y. Polyhach, M. Sajid, A. Godt, G. Jeschke, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 5854–5866.
- [20] J. A. Qiu, H. L. Wilson, M. J. Pushie, C. Kisker, G. N. George, K. V. Rajagopalan, *Biochemistry* **2010**, *49*, 3989–4000.
- [21] a) G. Jeschke, *Z. Phys. Chem.* **2012**, *226*, 1395–1414; b) G. Jeschke, *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8*, 3854–3863; c) Y. Polyhach, E. Bordignon, G. Jeschke, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 2356–2366; d) Y. Polyhach, G. Jeschke, *Spectroscopy* **2010**, *24*, 651–659.
- [22] a) H. M. Berman, L. F. Ten Eyck, D. S. Goodsell, N. M. Haste, A. Kornev, S. S. Taylor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 45–50; b) A. C. Newton, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2353–2364; c) M. Zhang, T. Tanaka, M. Ikura, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 758–767.
- [23] M. Connolly, *J. Appl. Crystallogr.* **1983**, *16*, 548–558.
- [24] S. Leimkühler, K. V. Rajagopalan, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 1837–1844.
- [25] S. Leimkühler, W. Klipp, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 2745–2751.

Eingegangen am 26. Mai 2015,
veränderte Fassung am 29. Juni 2015
Online veröffentlicht am 18. August 2015