

# Isoprenoidbiosynthese in pathogenen Bakterien: Nukleare inelastische Streuung ermöglicht Einblicke in den ungewöhnlichen [4Fe-4S]-Cluster vom *E.-coli*-Protein LytB/IspH\*\*

Isabelle Faus, Annegret Reinhard, Sergej Rackwitz, Juliusz A. Wolny, Kai Schlage, Hans-Christian Wille, Aleksandr Chumakov, Sergiy Krasutsky, Philippe Chaignon, C. Dale Poulter, Myriam Seemann\* und Volker Schünemann\*

**Abstract:** Das Protein LytB/ISPH katalysiert den letzten Schritt des Methylerythritolphosphat (MEP)-Wegs, der zur Terpenoidbiosynthese in vielen pathogenen Bakterien dient. Deswegen gilt der MEP-Weg als Angriffspunkt für neue potentielle Antibiotika, da er essenziell für Mikroorganismen ist, beim Menschen jedoch nicht vorkommt. Substratfreies LytB hat einen besonderen [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Cluster mit einer bisher unbekannten Struktur. Experimente mit nuklearer inelastischer Streuung (NIS, oder „nuclear resonance vibrational spectroscopy“, NRVs) in Kombination mit quantenchemischen-molekülmechanischen (QM/MM) Rechnungen zeigen, dass das apikale Eisen des Clusters eindeutig mit drei Wassermolekülen koordiniert ist. Zusätzlich präsentieren wir NIS-Experimente von LytB gebunden mit dem natürlichen Substrat (E)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl-diphosphat (HMBPP) sowie mit den Inhibitoren (E)-4-Amino-3-methylbut-2-en-1-yl-diphosphat und (E)-4-Mercapto-3-methylbut-2-en-1-yl-diphosphat.

Krankheitsverursachende Mikroorganismen sind zusehends resistent gegen Antibiotikatherapien geworden, während Krankheiten, die als ausgerottet galten, verstärkt wieder auftauchen. Tuberkulose beispielsweise ist sogar in den Industrieländern wieder auf dem Vormarsch und verursacht weltweit mehr als 1.1 Millionen Tote pro Jahr. Der Methylerythritolphosphat (MEP)-Weg<sup>[1]</sup> stellt eine Alternative zum Mevalonatweg<sup>[2]</sup> dar und wird bei der Biosynthese von Isopentenylidiphosphat (IPP, **1**) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP, **2**) beschritten. Diese entscheidenden Bausteine sind an der Bildung von essenziellen Terpenoiden der meisten

pathogenen Bakterien (unter anderem *Mycobacterium tuberculosis*) und Pflanzenplastiden beteiligt. Deswegen gilt der MEP-Weg als Angriffspunkt bei der Entwicklung von neuen antimikrobiellen Stoffen, da er essenziell für Mikroorganismen ist, beim Menschen jedoch nicht vorkommt.<sup>[3]</sup> Im letzten Schritt dieser Biosyntheseroute wird (E)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl-diphosphat (HMBPP, **3**) in eine Mischung von IPP (**1**) und DMAPP (**2**) umgewandelt (Schema 1).

Diese Reaktion wird von einem besonderen [4Fe-4S]-Zentrum des Proteins LytB/IspH katalysiert.<sup>[4]</sup> Substratfreies LytB enthält einen speziellen diamagnetischen [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Cluster, der EPR-inaktiv ist. Zwei Mößbauer-spektroskopische Studien haben unabhängig voneinander berichtet, dass eines der vier Eisen von substratfreiem LytB eine ungewöhnlich große Isomerieverschiebung ( $\delta = 0.89 \text{ mm s}^{-1}$ ) aufweist.<sup>[4,5]</sup> Dieser Wert ist innerhalb des experimentellen Fehlers identisch mit dem ungewöhnlichen vierten Eisenplatz in der citratgebundenen Form von Aconitase.<sup>[6]</sup> Aus diesem Grund wurde vorgeschlagen, dass die Koordinationssphäre dieses speziellen Eisenplatzes drei anorganische Schwefel vom Eisen-Schwefel-Cluster umfasst, sowie zusätzlich drei oder zwei Nicht-Schwefel-Liganden (O und/oder N) in einer Bindungsart, die ähnlich zu der von substratgebundener Aconitase ist.<sup>[4,6]</sup>

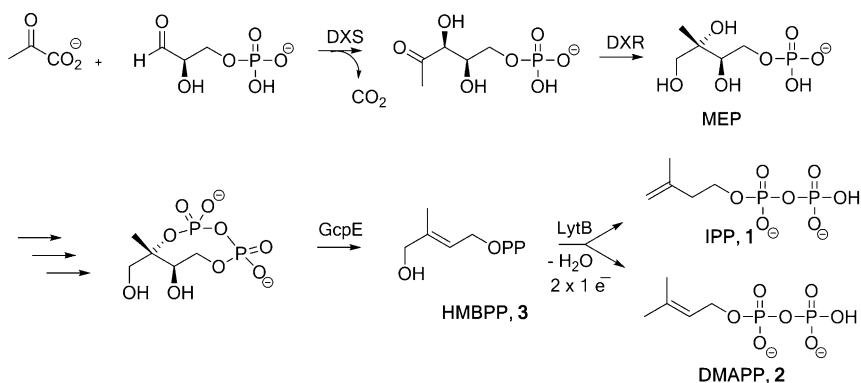
Erste Röntgenstrukturanalysen von substratfreiem LytB von *Aquifex aeolicus*<sup>[7]</sup> und *Escherichia coli*<sup>[8]</sup> deuteten auf das Vorhandensein eines [3Fe-4S]<sup>+</sup>-Clusters hin. In späteren Veröffentlichungen wurde die Struktur von HMBPP-gebundenem LytB von *E. coli* zu einer Struktur mit einem [4Fe-4S]-

[\*] Dr. P. Chaignon, Dr. M. Seemann  
Université de Strasbourg, UMR 7177 CNRS, Institut Le Bel  
4 rue Blaise Pascal, CS 90032  
67081 Strasbourg Cedex (Frankreich)  
E-Mail: mseemann@unistra.fr  
Dipl.-Biophys. I. Faus, Dr. A. Reinhard, Dr. S. Rackwitz,  
Dr. J. A. Wolny, Prof. V. Schünemann  
Fachbereich Physik, TU Kaiserslautern  
Erwin-Schrödinger-Straße 46  
67653 Kaiserslautern (Deutschland)  
E-Mail: schuene@physik.uni-kl.de  
Dr. K. Schlage, Dr. H.-C. Wille  
P01, Petra III, DESY  
Notkestraße 85, 22607 Hamburg (Deutschland)  
Dr. A. Chumakov  
ESRF—The European Synchrotron, CS40220  
38043 Grenoble Cedex 9 (Frankreich)

Dr. S. Krasutsky, Prof. C. D. Poulter  
Department of Chemistry, University of Utah  
315 South 1400 East RM 2020, Salt Lake City, UT 84112 (USA)

[\*\*] Wir sind Prof. M. Rohmer dankbar für die hilfreichen Anregungen. Wir danken Prof. A. Boronat (Universität von Barcelona, Spanien) und seiner Gruppe für die Bereitstellung des LytB überexprimierenden *E.-coli*-Stamms. Wir danken M. Parisse für technische Betreuung. Diese Arbeit wurde unterstützt von „Agence Nationale de la Recherche“ (ANR-2011-BSV5-028) und COST Action 1201 an M.S., sowie von NIH grant GM25521 an C.D.P. als auch vom SFB/TRR 88 „Cooperative Effects in Homo- and Heterometallic Complexes (3MET)“, von NANOKAT und dem BMBF unter 05K13UK2 an V.S.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201502494> zu finden.



**Schema 1.** Methylerythritolphosphat (MEP)-Weg. DXS: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase; DXR: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase; GcpE: 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclo-diphosphat-Reduktase; LytB: 4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl-1-phosphat-Reduktase.

Cluster verfeinert.<sup>[9]</sup> Ebenso wurde von zwei Strukturen von LytB mit dem [4Fe-4S]-Cluster gebunden an (*E*)-4-Amino-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphat (**4**) oder (*E*)-4-Mercapto-3-methylbut-2-en-1-yl-diphosphat (**5**), zwei Analoge zu HMBPP, berichtet.<sup>[10]</sup>

Für diese Amino- und Thiolanaloge von HMBPP wurde gezeigt, dass sie mit  $K_i = 20$  nm bzw.  $K_i = 54$  nm extrem wirksame LytB-Inhibitoren sind.<sup>[11]</sup> Die Kristallstruktur von substratfreiem LytB im [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zustand konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden. Dieses Fehlen einer Struktur hat uns motiviert, eine spektroskopische Untersuchung mittels nuklearer inelastischer Streuung (NIS) in Kombination mit auf Dichtefunktionaltheorie basierenden quantenchemischen-molekülmechanischen (QM/MM) Rechnungen durchzuführen,<sup>[12]</sup> um mehr Einblick in die Struktur von substratfreiem LytB zu erhalten. Hier präsentieren wir ebenfalls NIS-Daten von LytB gebunden an sein natürliches Substrat **3** sowie an die Inhibitoren **4** oder **5**. NIS<sup>[13,14]</sup> ermöglicht die Detektion von molekularen Schwingungen, an denen Eisen beteiligt ist und reagiert spezifisch auf die Bewegung des Mößbauer-Isotops <sup>57</sup>Fe. Somit ist NIS komplementär zu anderen Schwingungsmethoden wie IR- oder Raman-Spektroskopie. Da jedoch keine optischen Auswahlregeln für NIS gelten, sind alle individuellen Moden des Eisens, die von Eisen-Ligand-Abständen abhängen, detektierbar. In Verbindung mit Simulationen, die auf quantenmechanischen Rechnungen des Eisenzentrums basieren,<sup>[15]</sup> kann NIS verwendet werden, um Strukturvorhersagen für das Eisenzentrum und seine Umgebung zu machen. Dies wurde bereits für die mit CO inhibierte Mo-Nitrogenase,<sup>[16]</sup> sowie für das aktive Zentrum der [NiFe]-Hydrogenase<sup>[17]</sup> gezeigt.

*E. coli*-Protein LytB, das über eine His<sub>6</sub>-Markierung verfügt, wurde auf <sup>57</sup>FeCl<sub>3</sub> enthaltenem LB („lysogeny broth“) hergestellt und unter anaeroben Bedingungen aufgereinigt, wie in Lit. [4] beschrieben. Da für NIS hohe Konzentrationen des Mößbauer-Isotops <sup>57</sup>Fe (> 3 mm) benötigt werden, wurde die Intaktheit des Enzyms durch Messen seiner Aktivität überprüft.<sup>[11]</sup> Die Aktivität war vor und nach der Konzentrierung gleich (800 nmolmin<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>).

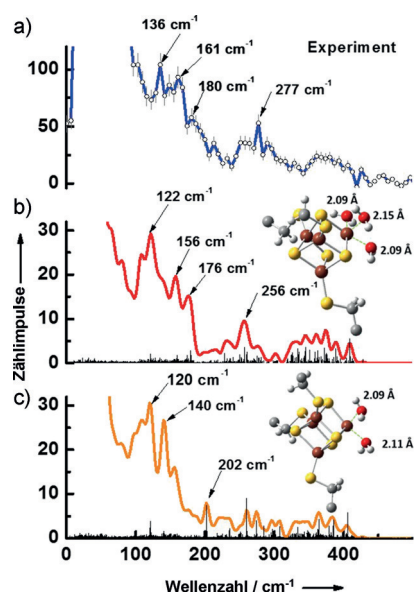
Die hier präsentierte Untersuchung zeigt, dass das [4Fe-4S]-Zentrum von substratfreiem LytB an die drei benach-

barten Schwefel des Clusters und an drei Wassermoleküle bindet, jedoch nicht an eine zusätzliche Aminosäure aus dem Proteinrückgrat. Abbildung 1a zeigt die experimentellen NIS-Daten (die Energieabhängigkeit der inelastischen Kernstreuungsprozesse) der substratfreien Form von LytB. Die NIS-Datensätze enthalten drei separate Regionen, wie es für [4Fe-4S]-Cluster typisch ist.<sup>[16,17]</sup> Die erste Region endet bei 240 cm<sup>-1</sup> und enthält mehrere voneinander getrennte Banden mit starken Maxima bei 136 cm<sup>-1</sup>, 161 cm<sup>-1</sup> und 180 cm<sup>-1</sup>. Die zweite Region reicht von 240 cm<sup>-1</sup> bis 340 cm<sup>-1</sup> mit einer besonders charakteristischen Bande bei 277 cm<sup>-1</sup>. Die dritte Region reicht von 340 cm<sup>-1</sup> bis 440 cm<sup>-1</sup>

und zeigt keine ausgeprägten Banden.

Um die Ligandenstruktur des ungewöhnlichen vierten Eisenplatzes bestimmen zu können, haben wir Simulationen der NIS-Daten mittels quantenmechanischer (QM) DFT-Rechnungen der [4Fe-4S]-Einheit mit verschiedenen Liganden in Kombination mit molekülmechanischen (MM) Rechnungen des ganzen Proteins durchgeführt.

Da das Einbringen des fehlenden Eisens in die Struktur von LytB ohne Substrat mit einem unvollständigen Fe/S-Cluster (pdb 3F7T) bereits auf das Vorhandensein von drei Wassermolekülen hingedeutet hat (siehe die Hintergrundinformationen von Lit. [4]), haben wir QM/MM-Simulationen mit diesem Strukturmodell durchgeführt.



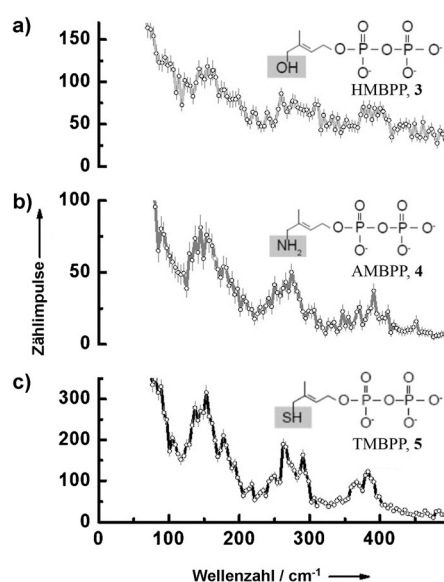
**Abbildung 1.** NIS-Daten der substratfreien Form vom LytB (a). Die simulierten NIS-Daten wurden mittels kombinierten quantenchemischen und molekülmechanischen (QM/MM) Rechnungen basierend auf dem PDB-Eintrag des substratfreien [3Fe-4S]-Clusters<sup>[8]</sup> von LytB (3F7T.pdb) unter der Annahme einer Modellstruktur des Clusters b) mit drei Wasserliganden und c) mit zwei Wasserliganden ermittelt. Fe braun, S gelb, O rot, C grau, H weiß.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 1b gezeigt. Der simulierte Datensatz zeigt ebenfalls Schwingungsbanden in den gleichen drei getrennten Regionen, wie in den NIS-Experimenten beobachtet. Die erste Region reicht bis etwa  $220\text{ cm}^{-1}$  mit drei getrennten Banden bei  $122\text{ cm}^{-1}$ ,  $156\text{ cm}^{-1}$  und  $176\text{ cm}^{-1}$  und enthält vor allem reine S-Fe-S'-Biegeschwingungen wie auch gemischte Biege- und Streckschwingungen. Unterhalb  $50\text{ cm}^{-1}$  existieren Proteinmoden, die eine Bewegung des Proteinrückgrats gekoppelt an die ganze [4Fe-4S]-Einheit aufweisen, aber keine Anteile von Eisen-Ligand-Schwingungen mit Biege- oder Streckcharakter enthalten. Die zweite Region von  $240$  bis  $340\text{ cm}^{-1}$  enthält vor allem reine Fe-S-Streckschwingungen und gemischte Biege- und Streckschwingungen mit einer deutlich ausgeprägten Bande bei  $256\text{ cm}^{-1}$ .

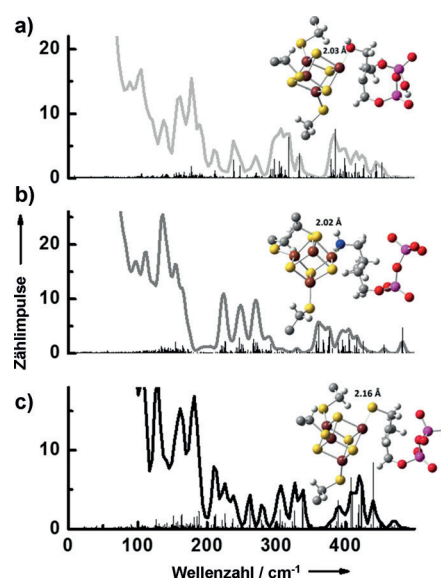
Diese Bande wird von mehreren nahezu entarteten Moden verursacht, wovon sich die intensivsten bei  $250.4$ ,  $256.6$ ,  $256.7$  und  $257.0\text{ cm}^{-1}$  befinden. Alle diese Moden sind charakteristisch für den ungewöhnlichen vierten Eisenplatz und haben beträchtlichen S-Fe-O-Streckcharakter verknüpft mit einer Rotation der Wasserliganden um die Fe-O-Bindung.

Diese charakteristische Bande ist ebenso in den experimentellen Daten bei  $277\text{ cm}^{-1}$  sichtbar. Die dritte Region erstreckt sich oberhalb von  $360\text{ cm}^{-1}$  und enthält Moden mit gemischtem Streck- und Biegecharakter sowie reine Fe-S-Streckschwingungen. Abbildung 1c zeigt die Resultate der QM/MM-Simulation des aktiven Zentrums mit zwei Wasserliganden. Die experimentell beobachteten drei Regionen, die hier bereits diskutiert und welche ebenfalls als NIS-Signaturen von synthetischen [4Fe-4S] $^{2+}$ -Modellen<sup>[18]</sup> und von Ferredoxin<sup>[19]</sup> beobachtet wurden, können von der Simulation mit zwei Wasserliganden nicht reproduziert werden. Außerdem zeigt die Simulation mit zwei Wasserliganden (Abbildung 1c) nicht die charakteristische Bande, die im Experiment bei  $277\text{ cm}^{-1}$  beobachtet wurde. Dies stützt unsere Schlussfolgerung, dass das ungewöhnliche vierte Eisen des [4Fe-4S]-Zentrums von substratfreiem LytB an drei Wasserliganden und an die drei benachbarten Schwefel im Cluster koordiniert ist.

Wir haben ebenfalls die NIS-Experimente an LytB gebunden an das natürliche Substrat **3** sowie an die Inhibitoren (*E*)-4-Amino-3-methylbut-2-en-1-yl-diphosphat (**4**) und (*E*)-4-Mercapto-3-methylbut-2-en-1-yl-diphosphat (**5**) durchgeführt (Abbildung 2a–c). Wie auch bei der substratfreien Form von LytB zeigen alle NIS-Datensätze drei separate Regionen. Abbildung 3 enthält die Resultate der berechneten NIS-Daten basierend auf den Röntgenkristallographiedaten.<sup>[9,10,20]</sup> Es zeigt sich eine angemessene Übereinstimmung zwischen berechneten und experimentellen Daten, die Abweichungen führen wir auf das Vorhandensein von leicht unterschiedlichen Proteinkonformationen in Proteinkristallen und -lösungen zurück. Für LytB gebunden an **4** wurde ebenfalls ein NIS-Datensatz, basierend auf der kürzlich von den Gruppen von Groll und Oldfield publizierten Struktur (siehe Abbildung S4c in den Hintergrundinformationen) berechnet. Dieser NIS-Datensatz zeigt ohne erkennbaren Grund signifikant weniger Übereinstimmung mit dem Experiment (Abbildung 2b) als die Rechnung basierend auf 3ZGL.pdb.<sup>[20]</sup>



**Abbildung 2.** NIS-Daten von a) LytB gebunden an sein Substrat **3**, b) LytB in Verbindung mit Inhibitor **4** und c) LytB in Verbindung mit Inhibitor **5**.



**Abbildung 3.** Simulierte NIS-Daten bestimmt mittels QM/MM-Rechnungen basierend auf den Kristallstrukturen des aktiven Zentrums bzw. der Inhibitor-Komplexe: a) LytB mit Substrat **3** (3KE8.pdb),<sup>[9]</sup> b) LytB mit Inhibitor **4** (3ZGL.pdb)<sup>[20]</sup> und c) LytB mit Inhibitor **5** (4H4E.pdb).<sup>[10]</sup> Fe braun, S gelb, O rot, C grau, H weiß, N blau, P lila.

Die zugehörigen partiellen Zustandsdichten (pDOS), die aus den experimentellen sowie aus den simulierten NIS-Daten (Abbildung 1, 2 und 3) bestimmt wurden, sind in Abbildung S2 und S3 zu sehen. Aus der pDOS ist es möglich, den Lamb-Mößbauer-Faktor ( $f_{\text{LM}}$ ) und verschiedene weitere thermodynamische Parameter, wie die mittlere quadratische Auslenkung ( $\langle x^2 \rangle$ ), die mittlere innere Energie ( $U$ ), die spezifische Wärmekapazität ( $c_v$ ), die Entropie ( $S_{\text{vib}}$ ), die freie



Enthalpie ( $G_{\text{vib}} = U - TS_{\text{vib}}$ ) und die normierte mittlere Kraftkonstante ( $D$ ) der Proteinproben zu berechnen. Tabelle S1 zeigt die Parameter, die aus der experimentellen pDOS (Abbildung S2, S3) für LytB gebunden an Substrat **3** und für substratfreies LytB berechnet wurden. Die mittlere Kraftkonstante für substratgebundenes LytB beträgt  $216 \text{ Nm}^{-1}$  und ist entsprechend geringer als die Kraftkonstante für substratfreies LytB, die  $260 \text{ Nm}^{-1}$  beträgt. Dies könnte darauf hindeuten, dass der [4Fe-4S]-Cluster der substratfreien Konformation von LytB in einem steiferen Zustand an das Protein gebunden hat als die substratgebundene Form, was sich in der kleineren mittleren Kraftkonstante äußert.

Ein weiterer Beweis für die Koordination von Wassermolekülen an den apikalen Eisenplatzes des [4Fe-4S]-Clusters kann in der Röntgenstruktur von LytB in Verbindung mit Propyldiphosphat, einem Inhibitor mit  $\text{IC}_{50} = 6.7 \mu\text{M}$  gefunden werden. In dieser Struktur lag ein Wassermolekül (oder ein Hydroxidion) gebunden an das apikale Eisen mit einer Fe-O-Bindungslänge von  $2.1 \text{ \AA}$  vor.<sup>[21]</sup>

Das Vorhandensein von drei labilen Wasserliganden am apikalen Eisen würde die Instabilität des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  in Kristallisationsexperimenten erklären. Die Tatsache, dass keine Kristalle mit einem kompletten [4Fe-4S] beobachtet werden konnten, kann auf die Sauerstoffempfindlichkeit des Enzyms zurückzuführen sein. GcpE, ein anderes Enzym des MEP-Wegs, wird als sauerstoffempfindlicher als LytB<sup>[22]</sup> beschrieben. Überraschenderweise zeigt die Röntgenstruktur von substratfreiem GcpE aus *A. aeolicus*<sup>[23]</sup> und *T. thermophiles*<sup>[24]</sup> ein besonderes Eisen im  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  in einer tetraedrischen Koordination, das mit einem Glutamat des Proteins verbunden ist. Diese Koordination zu einem Proteinrest und nicht zu Wasser erhöht die Stabilität des Proteins, und die berichtete Sauerstoffempfindlichkeit beruht möglicherweise auf einer stärkeren Exposition des Fe/S-Clusters gegenüber dem Lösungsmittel.

Außer bei der substratgebundenen Aconitase<sup>[6]</sup> wurde ein koordinierendes Wasser/Hydroxidion auch in der Röntgenstruktur von anderen [4Fe-4S]-Enzymen, die einen Dehydratationsschritt katalysieren, z. B. bei der (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydrase ( $\alpha$ -Cluster) aus *Clostridium difficile*<sup>[25]</sup> und der Quinolitat-Synthase von *Thermotoga maritima*,<sup>[26]</sup> gefunden. Unseres Wissens ist die Koordination von drei Wassermolekülen an einen [4Fe-4S]-Cluster erstmals mit dieser Studie nachgewiesen worden.

Der Mechanismus der Reaktion, die von LytB katalysiert wird, ist Gegenstand der Forschung, aber es ist mittlerweile bewiesen, dass es sich beim ersten Schritt des Mechanismus um die Bindung einer OH-Gruppe des Substrates an das apikale Eisen des [4Fe-4S] handelt. Vorangegangene Untersuchungen mittels Mößbauer-Spektroskopie haben eine Veränderung der Koordinationsgeometrie des Eisens bei der Substratbindung von oktaedrisch zu tetraedrisch nahegelegt.<sup>[27]</sup> Gemäß der hier präsentierten Untersuchungen geht diese Substratbindung sehr wahrscheinlich mit einer Freisetzung von drei Wassermolekülen einher.

**Stichwörter:** Nukleare Inelastische Streuung · Inhibitoren · LytB (IspH) · Methylerythritolphosphat-Weg · Metalloenzyme

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 12584–12587  
*Angew. Chem.* **2015**, *127*, 12771–12775

- [1] a) M. Rohmer, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 565–574; b) W. Eisenreich, F. Rohdich, A. Bacher, *Trends Plant Sci.* **2001**, *6*, 78–84.
- [2] K. Bloch, *Steroids* **1992**, *57*, 378–383.
- [3] M. Rohmer, C. Grosdemange-Billiard, M. Seemann, D. Tritsch, *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2004**, *5*, 154–162.
- [4] M. Seemann, K. Janthawornpong, J. Schweizer, L. H. Böttger, A. Janoschka, A. Ahrens-Botzong, E. N. Tambou, O. Rotthaus, A. X. Trautwein, M. Rohmer, V. Schünemann, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13184–13185.
- [5] Y. Xiao, L. Chu, Y. Sanakis, P. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9931–9933.
- [6] H. Beinert, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 2–15.
- [7] I. Reikittke, 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.
- [8] T. Gräwert, F. Rohdich, I. Span, A. Bacher, W. Eisenreich, J. Eppinger, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5756–5759; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5867–5870.
- [9] T. Gräwert, I. Span, W. Eisenreich, F. Rohdich, J. Eppinger, A. Bacher, M. Groll, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 1077–1081.
- [10] I. Span, K. Wang, W. Wang, J. Jauch, W. Eisenreich, A. Bacher, E. Oldfield, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 2118–2121; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 2172–2175.
- [11] K. Janthawornpong, S. Krasutsky, P. Chaignon, M. Rohmer, C. D. Poulter, M. Seemann, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1816–1822.
- [12] H. M. Senn, W. Thiel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1198–1229; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1220–1254.
- [13] M. Seto, Y. Yoda, S. Kikuta, X. W. Zhang, M. Ando, *Phys. Rev. Lett.* **1995**, *74*, 3828–3831.
- [14] W. Sturhahn, T. S. Toellner, E. E. Alp, S. Zhang, M. Ando, Y. Yoda, S. Kikuta, M. Seto, C. W. Kimball, B. Dabrowski, *Phys. Rev. Lett.* **1995**, *74*, 3832–3835.
- [15] M. Maylis Orio, D. A. Pantazis, F. Neese, *Photosynth. Res.* **2009**, *102*, 443–453.
- [16] A. D. Scott, V. Pelmenchikov, Y. Guo, L. Yan, H. Wang, S. J. George, C. H. Dapper, W. E. Newton, Y. Yoda, Y. Tanaka, S. P. Cramer, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15942–15954.
- [17] S. Kamali, H. Wang, D. Mitra, H. Ogata, W. Lubitz, B. C. Manor, T. B. Rauchfuss, D. Byrne, V. Bonnefoy, F. E. Jenney, Jr., M. W. W. Adams, Y. Yoda, E. Alp, J. Zhao, S. P. Cramer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 724–728; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 752–756.
- [18] Y. Xiao, M. Koutmos, D. A. Case, D. Coucouvanis, H. Wang, S. P. Cramer, *Dalton Trans.* **2006**, 2192–2201.
- [19] D. Mitra, V. Pelmenchikov, Y. Guo, D. A. Case, H. Wang, W. Dong, M.-L. Tan, T. Ichiye, F. E. Jenney Jr., M. W. W. Adams, Y. Yoda, J. Zhao, S. P. Cramer, *Biochemistry* **2011**, *50*, 5220–5235.
- [20] F. Borel, E. Barbier, S. Kratsutsky, K. Janthawornpong, M. Rohmer, C. D. Poulter, J. L. Ferrer, M. Seemann, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [21] I. Span, K. Wang, W. Wang, Y. Zhang, A. Bacher, W. Eisenreich, K. Li, C. Schultz, E. Oldfield, M. Groll, *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1042.
- [22] M. Wolff, M. Seemann, B. Tse Sum Bui, Y. Frapart, D. Tritsch, A. Garcia-Estrabot, M. Rodríguez-Concepción, A. Boronat, A. Marquet, M. Rohmer, *FEBS Lett.* **2003**, *541*, 115–120.
- [23] M. Lee, T. Gräwert, F. Quitterer, F. Rohdich, J. Eppinger, W. Eisenreich, A. Bacher, M. Groll, *J. Mol. Biol.* **2010**, *404*, 600–610.
- [24] I. Reikittke, T. Nonaka, J. Wiesner, U. Demmer, E. Warkentin, H. Jomaa, U. Ermler, *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 447–451.

- [25] S. H. Knauer, W. Buckel, H. Dobbek, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4342–4347.
- [26] M. V. Cherrier, A. Chan, C. Darnault, D. Reichmann, P. Amara, S. Ollagnier de Choudens, J. C. Fontecilla-Camps, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 5253–5256.
- [27] A. Ahrens-Botzong, K. Janthawornpong, J. A. Wolny, E. N. Tambou, M. Rohmer, S. Krasutsky, C. D. Poulter, V. Schüemann, M. Seemann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11976–11979; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 12182–12185.
- Eingegangen am 18. März 2015  
Online veröffentlicht am 26. Juni 2015
-