

Guanidin-Ferrohäm-Koordination in der Proteinmutante Nitrophorin 4(L130R)**

Chunmao He, Martin R. Fuchs, Hideaki Ogata* und Markus Knipp*

Das Arg130:N^o-Atom ist in der Lage, das Häm-Eisen in der neuen L130R-Mutante des Hämproteins Nitrophorin 4 (NP4) bei niedriger Temperatur zu koordinieren. NP4 ist ein Ferrihämprotein, das im Speichel des blutsaugenden Insekts *Rhodnius prolixus* vorkommt. Röntgenstrukturaufklärung zeigt, dass die Proteinfaltung des NP4 der der antiparallelen 8-strängigen β-Fass-Grundstruktur der Lipocaline entspricht.^[1] Der Häm-*b*-Cofaktor, der sich typischerweise im Ferrihäm-Zustand befindet, ist im Fass eingebettet und dabei über His59:N^r koordiniert, während die distale Koordinationsstelle nicht durch eine Aminosäure besetzt ist. Stattdessen ist die distale Fe-Koordinationsstelle in der Lage, verschiedene niedermolekulare Liganden zu binden, unter anderem Wasser, NO, NO₂⁻, CN⁻ und Imidazol (ImH).^[2] Während unserer Studien zum Reaktionsmechanismus von NP4 mit NO₂⁻^[3] haben wir eine Proteinmutante NP4(L130R) mit überraschenden Eigenschaften erzeugt, die wir hier vorstellen.

Das in der distalen Tasche liegende Leu130 wurde unter anderem zur Mutation ausgewählt, da aufgrund bekannter Röntgenstrukturdaten anzunehmen ist, dass diese Seitenkette, die einen Teil der flexiblen G-H-Schleife bildet, genügend Platz haben sollte, die Faltung auch nach der Mutagenese nicht zu stören.^[4,5] Expression und Reinigung von NP4(L130R) ergeben Proteinmengen, die vergleichbar zum Wildtyp(wt)-Protein sind. Absorptionsspektren (siehe Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen) und Resonanz-Raman(RR)-Spektren (Abbildung S2) sind denen des wt-Proteins sehr ähnlich. Es handelt sich also um einen sechsfach koordinierten (6c) High-Spin(HS)-Fe^{III}-Komplex ($S = \frac{5}{2}$),

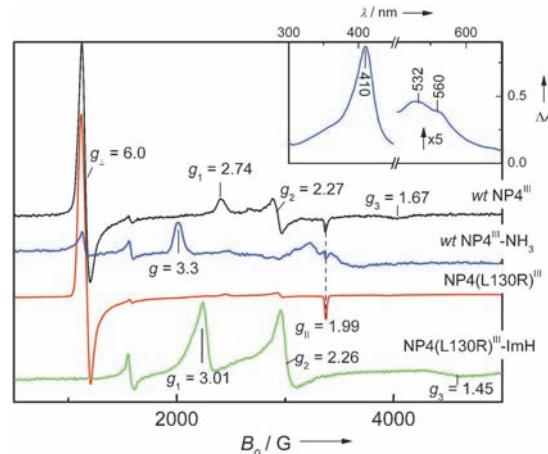


Abbildung 1. X-Band-EPR-Spektren von NP4 (schwarz), NP4[NH₃] (blau), NP4(L130R) (rot) und NP4(L130R)[ImH] (grün), aufgenommen bei 10 K. Die Proben waren in 100 mM HEPES/NaOH, 25% Glycerin (pH 7.2) gelöst, mit Ausnahme von NP4[NH₃], das in 2 M NH₄OAc, 100 mM MOPS/NaOH (pH 7.5) gelöst war. Einschub: Absorptionspektrum von NP4[NH₃] in 2 M NH₄OAc, 100 mM MOPS/NaOH (pH 7.5) bei Umgebungstemperatur. HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure; MOPS = 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure.

d.h. mit gebundenem Wasserliganden. Das ist in guter Übereinstimmung mit den axialen Continuous-Wave(cw)-EPR-Spektren in Abbildung 1, die typisch für HS-Ferrihämproteine mit schwachem axialem Ligandenfeld sind, wie z.B. NP4^[3b] (Abbildung 1). Allerdings ist im Falle von NP4 ein signifikanter Beitrag einer Low-Spin(LS)-Komponente zu beobachten, die dem Komplex mit OH⁻ aufgrund teilweiser Deprotonierung des Wasserliganden zugeschrieben wird,^[6] was offenbar in NP4(L130R) nicht passiert.

Die große distale Tasche der NPs erlaubt die Aufnahme relativ großer Liganden, z.B. ImH oder Histamin. Komplexe mit ImH gehören zu den am besten charakterisierten LS-Spezies ($S = \frac{1}{2}$) der NPs. Die Größe von ImH gepaart mit der Sensitivität des *g*-Tensors in Bezug auf die axiale Orientierung relativ zur Häm-N_{Pyrrol}-Fe-N_{Pyrrol}-Achse^[7] ermöglicht es, den Einfluss der Mutation auf die Häm-Tasche mittels EPR-Spektroskopie zu studieren. Das cw-EPR-Spektrum von NP4(L130R)[ImH] ist in Abbildung 1 dargestellt. Die *g*-Werte sind vergleichbar zu denen anderer NP[ImH]-Komplexe, wie man aus Tabelle 1 ersieht. Der leicht verstärkte *g*-Strain der Mutante spiegelt eine etwas höhere Inhomogenität in der ImH-Orientierung wider.^[7] NP4(L130R)[ImH] entspricht jedoch weitgehend der Koordinationsgeometrie der wt-Struktur.

Kristalle von NP4(L130R) wurden nach ungefähr 2 Wochen in 3.2 M Ammoniumphosphat (pH 7.4) erhalten,

[*] C. He, Dr. H. Ogata, Dr. M. Knipp
Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie
Stiftstraße 34-36, 45470 Mülheim a.d. Ruhr (Deutschland)
E-Mail: ogata@mpi-muelheim.mpg.de
mknipp@mpi-muelheim.mpg.de

Dr. M. R. Fuchs
Synchrotron-Lichtquelle Schweiz, Paul-Scherrer-Institut
5232 Villigen (Schweiz)

[**] Wir danken Yvonne Brandenburger, Jan Hanis, Robyn L. Kosinsky, Koji Nishikawa, Alina Steinbach, Johanna J. Taing, dem Personal der Beamline BL14.2 am BESSYII (Helmholtz-Zentrum Berlin, Deutschland), Florian Dworkowski und Guillaume Pompidor (Spectrolab-Abteilung der Beamline X10SA der SLS) für die technische Unterstützung sowie F. Ann Walker (University of Arizona, Tucson, AZ) für den NP4-Expressionsplasmid. Diese Arbeit wurde durch die Max-Planck-Gesellschaft und die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Grants KN 951-1/1 und KN 951-1/2, an M.K.) finanziell unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201108691> zu finden.

Tabelle 1: Vergleich der *g*-Werte des ImH-Komplexes von NP4(L130R) zu denen von wt-NP4, -2 und -7.

| | <i>g</i> ₁ | <i>g</i> ₂ | <i>g</i> ₃ | Lit. |
|------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------|
| NP4(L130R) | 3.01 | 2.26 | 1.45 | diese Arbeit |
| wt-NP4 | 3.02 | 2.25 | 1.46 | [9] |
| wt-NP2 | 3.02 | 2.26 | 1.37 | [10] |
| wt-NP7 | 3.07 | 2.19 | 1.36 | [11] |

was den Bedingungen für wt-NP4 entspricht.^[1,4,8] Kristalle von NP4(L130R)[ImH] wurden durch Waschen in Stammlösung mit 10 mM ImH vor dem Einfrieren erhalten. Datensätze der Röntgenbeugung wurden bei 100 K aufgenommen, und die Strukturen von NP4(L130R) und NP4(L130R)[ImH] wurden über molekularen Ersatz mit Auflösungen von 1.3 bzw. 1.4 Å erhalten. Die Parameter der kristallographischen Analyse sind in Tabelle S1 zusammengefasst. Vergleiche der Gesamtstrukturen von NP4(L130R) und NP4(L130R)[ImH] mit denen des jeweiligen wt-Proteins sind in den Abbildungen S3 und S4 dargestellt. Insgesamt ist der Einfluss der Mutation auf die Gesamtstruktur vernachlässigbar, was durch die hohe Übereinstimmung von NP4 und NP4(L130R) (mittlerer quadratischer Fehler (RMSD)=0.49 Å) bzw. NP4-[ImH] und NP4(L130R)[ImH] (RMSD=0.69 Å) deutlich wird.

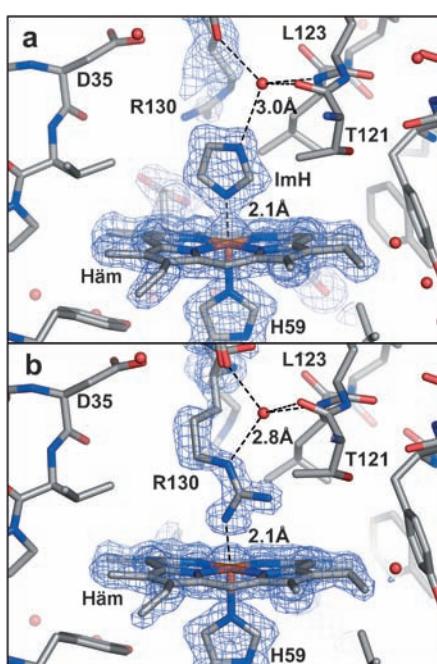
Eine detaillierte Ansicht der Häm-Taschen von NP4-(L130R)[ImH] und NP4(L130R) ist in Abbildung 2 dargestellt. Im Fall von NP4(L130R)[ImH] wurde eine einzige Kristallform, mit Charakteristika ähnlich zu wt-NP4[ImH] beobachtet.^[12] Die Seitenkette von Arg130 ist dabei wie Leu130 im wt zur Front der distalen Tasche hin orientiert, wobei der ImH-Ligand nicht gestört wird. Die Ähnlichkeit

der Häm-Taschen spiegelt sich zudem in einer vergleichbaren Deformation von der Häm-Planarität wider (Abbildung S5).

Arg130 nimmt in der Häm-Tasche von NP4(L130R) zwei Konformationen ein (Abbildung S3). Überraschenderweise ist in der Form mit dem höheren Anteil (ca. 60 %) Fe axial von Arg130:N^ω mit einem Atomabstand von 2.1 Å koordiniert (Abbildung 2B). Nach unserem besten Wissen ist dies das erste Beispiel eines Arg-koordinierten Metalloporphyrins. Die kristallographischen Resultate sind auch im Hinblick auf die spektroskopischen Daten überraschend, die keinen Hinweis auf eine starke Interaktion von Arg130:N^ω mit Fe geben, so wie es die Bindungslänge vermuten lässt.

Beispiele von Koordinationsverbindungen mit Guanidinliganden sind selten, in Biomolekülen fast unbekannt.^[13] Der hohe *pK_S*-Wert der Guanidine stellt eine große präparative Herausforderung dar (z. B. Arginin: ca. 12.5), da in wässrigem Medium die Deprotonierung sehr erschwert ist.^[13c] Metallkomplexe von Guanidinen wurden von Cr^{II}, Mn^{II}, Fe^{II}, Co^{II}, Ni^{II}, Cu^{I/II}, Zn^{II}, Pd^{II}, Pt^{II} und Au^I beschrieben, wobei in allen Fällen die Koordination über den Imin-Stickstoff erfolgt.^[13,14] Entsprechend wird die Koordination C=N^ω(H)-Fe über das freie Elektronenpaar an N^ω erfolgen. Der Abstand C-N^ωH(Fe) (1.32 Å) ist tatsächlich etwas kleiner im Vergleich zum Abstand C-N^ωH₂ (1.33 Å), obwohl die Auflösung eine genaue Bestimmung nicht zulässt. Von den rund 150 Guanidin-Metall-Verbindungen in der Cambridge Structural Database (CSD) sind die meisten Diguanidine, und nur vier Beispiele von Monoguanidin-Metall-Verbindungen wurden beschrieben.^[13d] Die wenigen Beispiele von Proteinstrukturen mit Arg:N^ω-Metall-Bindungen sind die Arginase von *Bacillus caldovelox* (Mn)^[15] und eine Variante einer menschlichen Carboanhydrase (Zn).^[16] Noch interessanter ist hier die Arg-Koordination eines der Fe im [2Fe-2S]-Cluster der Biotin-synthase BioB,^[13e,17] nicht zuletzt weil nur sehr wenige Fe-Guanidin-Komplexe überhaupt beschrieben wurden.^[13b,14a,e,f] Die sehr geringe Auflösung dieser Struktur (3.4 Å, PDB-Eintrag 1R30) gibt jedoch keine genauen Bindungsparameter her. Kürzlich veröffentlichte QM/MM-Rechnungen an vier Modellkomplexen bestätigen die Anordnung C=N^ω(H)-Fe.^[13e] Insgesamt ist der Abstand N^ω-Fe etwas größer als der durchschnittliche Abstand N_{Guanidin}-Mⁿ⁺ von 1.91 ± 0.06 Å der synthetischen Guanidin-Komplexe,^[13d] ist jedoch sehr ähnlich zum Abstand N^ω-Fe im Komplex [Fe-(TMG₃tren)NCCH₃]²⁺ (2.07–2.25 Å; TMG₃tren = tris(tetramethylguanidino)tren; tren = tris(2-aminoethyl))^[13b] und zu dem für die BioB-[2Fe-2S]-Clustermodelle berechneten (2.05–2.18 Å).^[13e] Der Winkel $\Delta(C=N^{\omega}-Fe) = 141^\circ$ ist größer als der durchschnittliche Winkel $\Delta(C=N-M^{n+}) = 129 \pm 2^\circ$, was wohl der Starrheit der Proteinstruktur geschuldet ist. Der Diederwinkel $\Delta(N^{\delta}-C=N^{\omega}-Fe) = 0^\circ$ ist sehr ähnlich zum durchschnittlichen Winkel in Guanidin-Metall-Verbindungen $\Delta(RNH-C=N^{\omega}-M^{n+}) = -1 \pm 9^\circ$.^[13d]

Ein Argument für die Schwachheit der Guanidin-Metall-ionsen-Komplexe ist die geringe Lewis-Basizität.^[13c] Unter den wenigen Metallkomplexen findet sich eine Fe^{II}-Verbindung, aber keine mit Fe^{III}.^[13b] Um zu überprüfen, ob Fe^{II} das koordinierende Ion im NP4(L130R)-Kristall ist, wurden Kristalle unter Beobachtung durch UV/Vis-Spektroskopie Röntgenstrahlung ausgesetzt. Dabei kam ein Mikrospektro-

**Abbildung 2:** Elektronendichteverteilung $2F_0 - F_c$ (Konturebene: 1σ) der Häm-Tasche von a) NP4(L130R)[ImH] (PDB-Eintrag 3TGB) und b) NP4(L130R) (PDB-Eintrag 3TGA). Die Elektronendichteverteilung beinhaltet das Häm und die Aminosäuren His59 und Arg130.

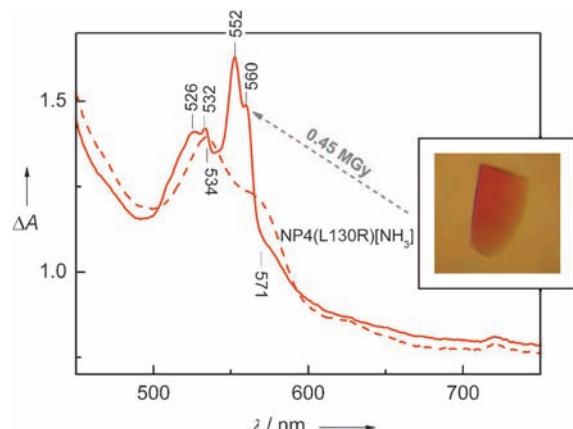


Abbildung 3. Absorptionsspektrum eines in 3.2 M Ammoniumphosphat (pH 7.4) gebildeten Kristalls von NP4(L130R) vor (gestrichelte Linie) und nach Röntgenbestrahlung (durchgezogene Linie). Einschub: Einkristall von NP4(L130R).

photometer an der Beamline zum Einsatz.^[18] Das anfängliche Absorptionsspektrum eines Kristalls ist in Abbildung 3 wiedergegeben. Es ist zu beachten, dass infolge des Kristallwachstums in Ammoniumphosphat NH₃ als distaler Fe-Ligand vorliegt. Obwohl dies vorher schon angenommen wurde,^[1,4,8,19] ist es bislang experimentell nicht gezeigt worden. Das Spektrum des Kristalls entspricht dem eines LS-Komplexes, was durch die zwei intensiven Q-Banden angezeigt wird. Zum Vergleich wurde das Spektrum von NP4-[NH₃] in Lösung aufgenommen (Abbildung 1 oben rechts). Das cw-EPR-Spektrum hiervon zeigt ebenfalls eine LS-Spezies an, was an dem hoch anisotropen LS(HALS)-Signal mit $g_{\max} = 3.3$ deutlich wird (Abbildung 1).

Der Kristall wurde anschließend mit einem Röntgenstrahl niedriger Intensität bestrahlt (12.4 keV, 3.5×10^{10} Photonen s⁻¹), während Spektren kontinuierlich über eine Zeitdauer von 5 min bis zu einer Dosis von 0.45 MGy aufgenommen wurden (Abbildung S6 A). Die Kinetik in Abbildung S6 B zeigt, dass die Photoreduktion des Kristalls zu 50% mit den ersten 0.2 MGy abgeschlossen ist, wobei augenscheinlich eine neue LS-Spezies erzeugt wird, wie man wiederum an den zwei scharfen Q-Banden in Abbildung 3 erkennt. Die Aufspaltung der Absorptionsbanden spiegelt die gleichzeitige Anwesenheit von NP4(L130R)[Fe^{II}–N^ω_{R130}] (526, 552 nm) und NP4(L130R)[Fe^I–NH₃] (532, 560 nm) wider, was durch Vergleich mit den Spektren von NP4(L130R)[Fe^{II/III}–NH₃] in Lösung zugeordnet werden kann (Abbildung S7). Die Gesamtdosis, die während der Aufnahme des Datensatzes zur Strukturaufklärung von NP4(L130R) angewendet wurde (Abbildung 2), war ca. 15-fach höher als die Gesamtdosis während der kinetischen Messungen. Das bedeutet, dass die Struktur den Ferrohäm-Zustand von NP4(L130R)[Fe^{II}–N^ω_{R130}] repräsentiert.

Allerdings erscheint das Absorptionsspektrum von NP4(L130R)[Fe^{II}] in Lösung, das durch sorgfältige Reduktion mit Na₂S₂O₄ hergestellt wurde (Abbildung 4, oben rechts), nicht verschieden von NP4[Fe^{II}].^[1,20] Der Hochfrequenzbereich (1200–1700 cm⁻¹) des in der Soret-Bande angeregten RR-Spektrums hat ein hohes diagnostisches Potential für die

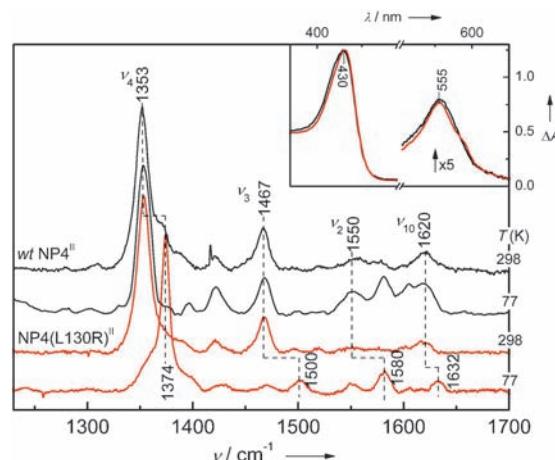
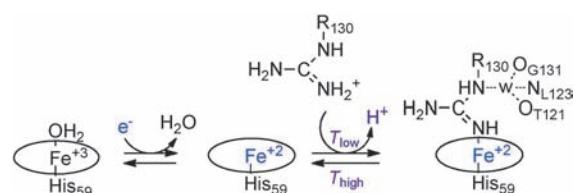


Abbildung 4. RR-Spektren von NP4 (schwarz) und NP4(L130R) (rot) in 100 mM HEPES/NaOH (pH 7.2) bei Raumtemperatur und 77 K ($\lambda_{\text{ex}} = 413.1$ nm). Einschub: Absorptionsspektren von NP4[Fe^{II}] und NP4(L130R)[Fe^{II}] bei Raumtemperatur.

Koordination und den Spin-Zustand von Hämproteinen.^[21] Das RR-Spektrum von NP4(L130R)[Fe^{II}] bei Raumtemperatur ist identisch mit dem von NP4[Fe^{II}] (Abbildung 4). So liegt die Markerbande des Oxidationszustands, v₄, sehr gut im Bereich der Ferrohämme (1350–1375 cm⁻¹).^[21,22] Die Markerbande des Koordinationszustands, v₃, ist empfindlich für Größenänderungen des Häm-Zentrums, das sich mit dem Spinzustand des Fe in Abhängigkeit vom Oxidationszustand ändert, d.h. 1460–1470 cm⁻¹ bei 5cHS-Fe^{II} und 1490–1510 cm⁻¹ bei 5cLS- oder 6cLS-Fe^{II}.^[22a,b,23] Entsprechend kann NP4[Fe^{II}] ebenso wie NP4(L130R)[Fe^{II}] dem zu erwartenden 5cHS zugeordnet werden. Demgegenüber führte die Wiederholung der RR-Spektroskopie bei 77 K zu einer signifikanten Änderung von v₄ und v₃ im Falle von NP4(L130R)[Fe^{II}] zu LS, was in Übereinstimmung mit dem Absorptionsspektrum des gefrorenen Kristalls ist (Abbildung 4). Zur Kontrolle wurde nach diesen Messungen die Probe aufgetaut, um sie mittels Absorptionsspektroskopie bei Raumtemperatur in Lösung zu vermessen. Dabei wurde wieder die HS-Spezies erhalten. Der temperaturabhängige HS \leftrightarrow LS-Übergang von NP4(L130R)[Fe^{II}] ist also vollständig reversibel. Koordinations- und Spinzustand von NP4[Fe^{II}] sind erwartungsgemäß temperaturunabhängig (Abbildung 4).

Schema 1 fasst die Resultate dieser Arbeit zusammen. Die Koordination von Arg130:N^ω zum Häm hängt stark von der Oxidationsstufe des Eisens (Fe^{II}) und von der Temperatur ab. Fe^{II} ist eine weichere Lewis-Säure als Fe^{III} und sollte



Schema 1. Reaktionsschema zur Verdeutlichung der Bindung des internen Arg130-Guanidins an Fe^{II} in NP4(L130R) (w = Sauerstoffatom des Wassers).

deswegen einen Imin-Stickstoff besser binden. Allerdings ist der Grund für die Temperaturabhängigkeit weniger klar. Das Vorkommen der Arg130:N^o-Koordination sowohl im Kristall als auch in gefrorener Lösung schließt Kristallisationsartefakte aus. Eine andere Möglichkeit könnte eine Änderung des pK_s-Wertes von Arg130 und/oder des pH-Wertes der Lösung sein, die beide temperaturabhängige Größen sind, wobei andererseits der pH in gefrorener Lösung im Prinzip nicht definiert ist. Eine Beeinflussung des Koordinations- bzw. Spinzustands durch die Temperatur wird auch zuweilen beobachtet. Zum Beispiel wurde im Falle von NP1[[FeNO]⁷] ($S=1/2$) eine Mischung aus 5c und 6c im EPR-Spektrum bei 4.2 K erhalten, während bei Raumtemperatur nur 6c im Absorptionspektrum vorkommt;^[24] RR-Spektroskopie von NP1[Fe^{III}] bei 298 K zeigt 6cHS (Wasser-gebunden) an, während bei 77 K 6cLS dominiert.^[25]

Bei einer Reihe von Hämproteinen ist eine Arg-Seitenkette in der distalen Häm-Tasche vorhanden. Eine Auswahl mit bekannter Röntgenstruktur und relevantem Arg:N-Fe-Abstand ist in Tabelle S2 aufgeführt. Allerdings ist NP4-(L130R) der einzige Fall, bei dem eine Arg:N^o-Fe-Bindung vorkommt. Abbildung 2b zeigt, dass ein Wassermolekül eine Wasserstoffbrücke zu Arg130:N^o(H) und drei weiteren Rückgratatomen bildet. Wie man in Abbildung 2a sieht, ist dieses Wasser auch in NP4(L130R)[ImH] vorhanden, koordiniert mit N¹(H) von ImH. Man findet es ferner in der Struktur von NP4[ImH] (PDB-Eintrag 1IKJ) und von NP4-[Histamin] (PDB-Eintrag 1IKE).^[12] Die Orientierung der Guanidin-Ebene zur Häm-N_{Pyrrrol}-Fe-N_{Pyrrrol}-Achse ist ähnlich zur Orientierung von ImH und Histamin in NP4, und auch die Bindungsabstände und -winkel sind vergleichbar (Tabelle S3). Die Ähnlichkeit zur Imin-N³-Koordination des Imidazols stützt die angenommene Imin-N^o-Koordination von Arg130.

Insgesamt zeigt diese Studie der nichtnatürlichen Proteinvariante NP4(L130R), dass eine Porphyrineisen-Guanidin-Bindung prinzipiell möglich ist. Es ist bemerkenswert, dass dies zuerst in einem Protein erreicht wurde. Der Vorteil der Proteinmatrix liegt zweifelsfrei darin, dass die Gesamtstruktur die Liganden zusammenhält, sodass Bindungsenergie aus dem Chelateffekt gewonnen wird. Außerdem muss Guanidin-Deprotonierung erreicht werden, was äußerst schwierig in Wasser ist, aber durch die veränderte Umgebung in einer Proteintasche möglich wird. Die schwache Koordination wird zusätzlich durch ein Wassermolekül stabilisiert. Schließlich wurde Stabilisierung durch niedrige Temperatur und Fe-Reduktion erreicht.

Eingegangen am 9. Dezember 2011
Online veröffentlicht am 14. Februar 2012

Stichwörter: Guanidin · Häm-Komplexe · Nitrophorine · Photoreduktion · Proteine

[1] E. M. Maes, S. A. Roberts, A. Weichsel, W. R. Montfort, *Biochemistry* **2005**, *44*, 12690–12699.

- [2] a) F. A. Walker, *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 216–236; b) M. Knipp, C. He, *IUBMB Life* **2011**, *63*, 304–312.
- [3] a) C. He, M. Knipp, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12042–12043; b) C. He, H. Ogata, M. Knipp, *Biochemistry* **2010**, *49*, 5841–5851.
- [4] E. M. Maes, A. Weichsel, J. F. Andersen, D. Shepley, W. R. Montfort, *Biochemistry* **2004**, *43*, 6679–6690.
- [5] Zwei Leu in der distalen Tasche, Leu123 und Leu133, haben einen großen Einfluss auf die Häm-Deformation und somit auf das Reduktionspotential: T. K. Shokhireva, R. E. Berry, E. Uno, C. A. Balfour, H. Zhang, F. A. Walker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3778–3783.
- [6] Dies wurde durch pH-Titration bestimmt (unveröffentlichte Ergebnisse, C.H. und M.K.). Für NP2 und NP3 ist bereits gezeigt worden, dass der pK_s-Wert des gebundenen Wassers relativ niedrig ist (10.1 bzw. 9.2): T. K. Shokhireva, R. E. Berry, H. Zhang, N. V. Shokhirev, F. A. Walker, *Inorg. Chim. Acta* **2008**, *361*, 925–940.
- [7] a) F. A. Walker, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 589–615; b) F. A. Walker, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *185*–186, 471–534.
- [8] M. Schmidt, K. Achterhold, V. Prusakov, F. G. Parak, *Eur. Biophys. J.* **2009**, *38*, 687–700.
- [9] R. E. Berry, X. D. Ding, T. K. Shokhireva, A. Weichsel, W. R. Montfort, F. A. Walker, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9*, 135–144.
- [10] T. K. Shokhireva, N. V. Shokhirev, F. A. Walker, *Biochemistry* **2003**, *42*, 679–693.
- [11] M. Knipp, F. Yang, R. E. Berry, H. Zhang, M. N. Shokhirev, F. A. Walker, *Biochemistry* **2007**, *46*, 13254–13268.
- [12] S. A. Roberts, A. Weichsel, Y. Qiu, J. A. Shelton, F. A. Walker, W. R. Montfort, *Biochemistry* **2001**, *40*, 11327–11337.
- [13] a) E. M. A. Ratilla, N. M. Kostic, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4427–4428; b) H. Wittmann, V. Raab, A. Schorm, J. Planckmeyer, J. Sundermeyer, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2001**, 1937–1948; c) P. J. Bailey, S. Pace, *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *214*, 91–141; d) L. Di Costanzo, L. V. Flores, Jr., D. W. Christianson, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2006**, *65*, 637–642; e) M. G. G. Fuchs, F. Meyer, U. Ryde, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, *15*, 203–212.
- [14] a) S. Pohl, M. Harmjanz, J. Schneider, W. Saak, G. Henkel, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2000**, 3473–3479; b) A. Neuba, S. Herres-Pawlis, U. Flörke, G. Henkel, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2008**, *634*, 771–777; c) S. Herres-Pawlis, U. Flörke, G. Henkel, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, 3815–3824; d) A. Neuba, R. Haase, M. Bernard, U. Flörke, S. Herres-Pawlis, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2008**, *634*, 2511–2517; e) F. A. Cotton, C. A. Murillo, D. J. Timmons, *Polyhedron* **1999**, *18*, 423–428; f) S. H. Oakley, D. B. Soria, M. P. Coles, P. B. Hitchcock, *Polyhedron* **2006**, *25*, 1247–1255; g) M. P. Coles, *Dalton Trans.* **2006**, 985–1001.
- [15] M. C. Bewley, P. D. Jaffrey, M. L. Patchett, Z. F. Kanyo, E. N. Baker, *Structure* **1999**, *7*, 435–448.
- [16] M. Ferraroni, S. Tilli, F. Briganti, W. R. Chegwidden, C. T. Supuran, K. E. Wiebauer, R. E. Tashian, A. Scozzafava, *Biochemistry* **2002**, *41*, 6237–6244.
- [17] a) R. B. Broach, J. T. Jarrett, *Biochemistry* **2006**, *45*, 14166–14174; b) F. Berkovitch, Y. Nicolet, J. T. Wan, J. T. Jarrett, C. L. Drennan, *Science* **2004**, *303*, 76–79.
- [18] R. L. Owen, A. R. Pearson, A. Meents, P. Boehler, V. Thominet, C. Schulze-Briese, *J. Synchrotron Radiat.* **2009**, *16*, 173–182.
- [19] D. A. Kondashov, S. A. Roberts, A. Weichsel, W. R. Montfort, *Biochemistry* **2004**, *43*, 13637–13647.
- [20] a) M. Knipp, J. J. Taing, C. He, *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 1405–1422; b) C. He, S. Neya, M. Knipp, *Biochemistry* **2011**, *50*, 8559–8575.
- [21] a) J. R. Kincaid in *The Porphyrin Handbook*, Vol. 7 (Hrsg.: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard), Academic Press, San Diego, **2000**, S. 225–291; b) T. G. Spiro, X.-Y. Li in *Resonance Raman Spectra of Heme and Metalloproteins* (Hrsg.: T. G. Spiro), Wiley, New York, **1988**, S. 1–38.

- [22] a) L. A. Andersson, M. Mylrajan, E. P. Sullivan, Jr., S. H. Strauss, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 19099–19102; b) T. Kitagawa, Y. Kyogoku, T. Iizuka, M. I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 5169–5173; c) T. G. Spiro, R. S. Czernuszewicz in *Physical Methods in Bioinorganic Chemistry. Spectroscopy and Magnetism*, (Hrsg.: L. Que, Jr.), University Science Books, Sausalito, **2000**, S. 59–119.
- [23] T. G. Spiro, J. D. Stong, P. Stein, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 2648–2655.
- [24] X. D. Ding, A. Weichsel, J. F. Andersen, T. K. Shokhireva, C. Balfour, A. J. Pierik, B. A. Averill, W. R. Montfort, F. A. Walker, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 128–138.
- [25] E. M. Maes, F. A. Walker, W. R. Montfort, R. S. Czernuszewicz, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11664–11672.