

Bestimmung hochauflöster dreidimensionaler Proteinstrukturen anhand der Festkörper-NMR-Spektren**

Anja Böckmann*

Faserproteine · Membranproteine ·
NMR-Spektroskopie · Proteinstrukturen

Die Bestimmung hochauflöster dreidimensionaler (3D) Proteinstrukturen zählt zu den wichtigsten Errungenschaften der Strukturbioologie. Diese Strukturen bilden die Basis für das detaillierte Verständnis von Funktionsmechanismen der jeweiligen Proteine; von Interesse ist dabei die Untersuchung der Enzymaktivität, des Transportes von Molekülen durch Membranen oder des Einsatzes mechanischer Kräfte. Hochauflöste 3D-Strukturen ermöglichen die Identifizierung von Schlüsselmotiven in Proteinen und damit die gezielte Entwicklung von Inhibitoren, die die Proteinfunktion hemmen können, sowie die Produktion von Mutanten, um bestimmte Fragen zu beantworten. 3D-Strukturen bilden die Voraussetzung für andere Strukturstudien – z. B. zur Aufklärung von Protein-Protein-Wechselwirkungen oder Wechselwirkungen mit Nucleinsäuren, Fetten oder Lösungsmitteln – und ermöglichen die ortsaufgelöste Beobachtung der Proteindynamik. Ohne 3D-Strukturen können Kenntnisse der Proteindynamik nicht in räumlich aufgelöste Information überführt werden.

Die Festkörper-NMR-Spektroskopie mit Rotation um den magischen Winkel (magic angle spinning, MAS) zur Strukturbestimmung einheitlich ^{13}C , ^{15}N -isotopenmarkierter Proteine hat in letzter Zeit große Fortschritte gemacht und ist auf dem Weg, gemeinsam mit der Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie in Lösung, eine bedeutende Technik in der Strukturbioologie zu werden. Die Festkörper-NMR-Spektroskopie zielt auf Strukturstudien von unlöslichen Proteinen ab, z. B. von Fibrillen oder Membranproteinen. Diese Proteine sind in der „Protein Data Bank“ unterrepräsentiert,^[1] da ihre Strukturen mit anderen Methoden schwierig zu bestimmen sind. Ein bedeutender Schritt hin zu einer Strukturaufklärung bestand in der Untersuchung voll-

ständig ^{13}C , ^{15}N -isotopenmarkierter Proteine mithilfe der Festkörper-NMR-Spektroskopie Ende der 1990er Jahre; anders als bei Studien, die auf selektive Isotopenmarkierungen setzen, lassen sich mit dieser Methode Informationen über die gesamte Proteinsequenz erhalten. Der Nachweis, dass sequenzielle Signalzuordnungen mithilfe von Festkörper-NMR-Experimenten möglich sind, war ein Durchbruch und erwies sich als nützlich für eine Fülle von Studien, die auf diesen chemischen Verschiebungen beruhen, darunter Studien zu Proteinwechselwirkungen, Proteindynamik und Proteinfaltung.

Für die Bestimmung dreidimensionaler hochauflöster Strukturen mithilfe der Festkörper-NMR-Spektroskopie sind allerdings zunächst zwei Fragen zu beantworten: Wie lassen sich Spektren aufnehmen, die Informationen über Abstände zwischen den Kernen enthalten, und wie können diese Informationen dann aus den Spektren extrahiert werden? In Proteinen können Abstände zwischen Protonen-, Kohlenstoff- und Stickstoffspins bestimmt werden. Im Fall der Protonen besteht die Schwierigkeit in der niedrigen Auflösung, während die Messung der Abstände zwischen Kohlenstoffspins von den allgegenwärtigen, starken Kopplungen von Spins direkt verbundener Atome behindert wird. Diese starken Kopplungen unterdrücken das Auftreten von schwachen Kopplungen („dipolar truncation“), und die Polarisierung ist sozusagen zwischen zwei direkt benachbarten Spins gefangen und kann kaum über die Stickstoffatome hinaus übertragen werden, die das Spinsystem begrenzen. Die Kombination der großen Zahl an Spins und die immer noch relativ breiten Linien in Festkörper-NMR-Spektren führen zu vielfältigen Zuordnungsmöglichkeiten, wenn ausschließlich die chemische Verschiebung betrachtet wird; die Zuordnung der Kreuzsignale ist daher in spektraler Hinsicht mehrdeutig, weshalb sich keine klaren Abstandsinformationen aus den Spektren herauslesen lassen.

Die erste Strukturberechnung unter Verwendung von umfassend markierten Proteinproben durch Oschkinat und Mitarbeiter im Jahr 2002 war daher ein Durchbruch.^[2] Eine umfassende Markierung wird durch Zugabe von $[1,3-^{13}\text{C}]$ - oder $[2-^{13}\text{C}]$ -Glycerin in das Wachstumsmedium erreicht. Dies führt zur „Schachbrett“-Markierung von ungefähr jedem zweiten Kohlenstoffatom, wobei benachbarte ^{13}C -Spins selten sind (Abbildung 1a). Dieses Muster verringert die Unter-

[*] Dr. A. Böckmann

Institut de Biologie et Chimie des Protéines UMR 5086
CNRS/Université de Lyon 1
IFR 128 BioSciences
7 passage du Vercors, 69367 Lyon (France)
Fax: (+ 33) 4-7272-2649
E-Mail: a.bockmann@ibcp.fr

[**] Ich danke für die Unterstützung durch die französische ANR (JC05_44957, ANR-07-PCVI-0013-03) sowie Antoine Loquet für Farbabbildungen und Birgit Habenstein für die deutsche Übersetzung.

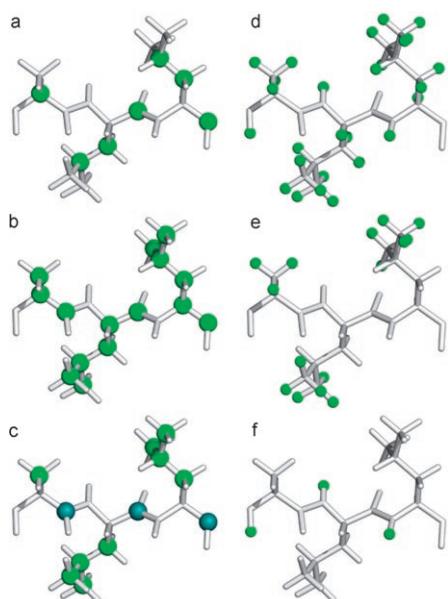


Abbildung 1. Spins, für die Abstandsbeschränkungen mit den im Text beschriebenen Experimenten erhalten werden können. a) ^{13}C -Spins in umfassend markierten Proben; b) alle Kohlenstoffspins, für die mithilfe von PDSD-, DARR- und PAR-Experimenten Abstandsbeschränkungen aufgenommen werden können; c) Spins von Carbonyl- (dunkelgrün) und aliphatischen Kohlenstoffatomen (hellgrün), die durch Rückkopplungsexperimente wie HBR² rückgekoppelt werden; d) Spins, die mit Messungen der H-H-Abstände durch CHHC- und e) durch J-CHHC-Experimente zugänglich sind; f) Spins, die durch Experimente mit einer direkten Protonendetektion an deuterierten Proben aufgenommen werden, deren ^2H -Atome teilweise wieder gegen ^1H -Atome zurückgetauscht worden sind.

drückung schwacher Kopplungen und erleichtert das Zuordnen. Fehlen NMR-aktive nächste Nachbarn, so tritt die starke Kopplung direkt benachbarter Spins nicht mehr auf, und die Zahl der Kohlenstoffsignale wird ungefähr halbiert, wodurch die spektrale Überlagerung entscheidend reduziert wird. Damit geht eine Verschmälerung der Signallinien einher, weil zusätzlich die *J*-Kopplung unterdrückt wird.

Ungeachtet ihres Erfolges erfordert diese Technik allerdings den Einsatz mehrerer unterschiedlich markierter Proben, um eine hochauflöste Struktur zu erhalten. Aus dem Wunsch nach einer allgemeineren Lösung unter Verwendung einer einzigen, vollständig markierten Probe resultierte daher eine Reihe von neuen Methoden. Die Messung von Abständen zwischen Protonen (Abbildung 1d) in festen Proteinen gelingt (analog zur NMR-Spektroskopie in Lösung), wenn die Protonen entweder auf Heteronuclei detektiert werden, die höher aufgelöste Spektren liefern, oder wenn die Detektion von Protonen durch hohe Magnetfelder, Hochfrequenz-MAS oder Probendeuterierung^[3-6] ermöglicht wird. Die Detektion der Abstandsbeschränkungen („distance restraints“) von Protonen, die an Kohlenstoff- und Stickstoffatome gebunden sind, für die Strukturanalyse von Proteinen wurde zuerst von Baldus und Mitarbeitern vorgeschlagen.^[7] Diese Methode liefert ähnliche Beschränkungen, wie man sie bei NOESY-Spektren (NMR-Spektroskopie in Lösung) erhält, und ergibt ebenfalls eine Radiusabhängigkeit von $1/r^6$. Ein 2D-Spektrum für das mikrokristalline Crh-Protein, das mit einem so ge-

nannten CHHC-Experiment (protonenvermittelten, Kohlenstoff detektierenden Korrelationsexperiment) erhalten wird, ist in Abbildung 2 gezeigt; es enthält Kreuzsignale, die

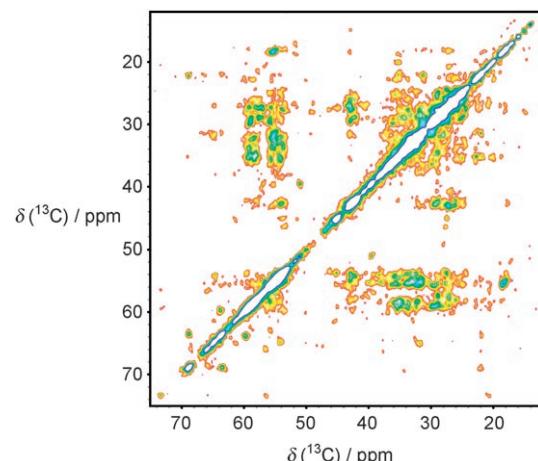


Abbildung 2. CHHC-Spektrum des vollständig markierten $2 \times 10.4\text{-kDa}$ -Crh-Proteins, aufgenommen bei einer Protonenfeldstärke von 500 MHz. Die Kreuzsignale enthalten Informationen zu lokalen, mittleren und großen Abständen.

Informationen zu lokalen und großen Abständen enthalten, und liefert alle notwendigen Informationen zur Strukturberechnung.^[8,9] Die Beziehung zwischen der Intensität der Kreuzsignale und den Entferungen ist weniger quantitativ als in NOESY-Spektren, da Mehrfach-Spin-Effekte (Wechselwirkungen mit den vielen anderen Spins des Systems) auftreten und Schwierigkeiten bestehen, die Polarisation von einem Kohlenstoffatom oder einem Stickstoffatom ausschließlich auf ein ausgewähltes benachbartes Proton zu übertragen; allerdings können semiquantitative Messungen durchgeführt werden. Das Auftreten eines Kreuzsignals (ohne genauere Analyse der Signalintensitäten) zeigt generell, dass sich zwei Spins in einem bestimmten Abstand zueinander befinden. Dieser Ansatz wurde zur Messung der Abstandsbeschränkungen im photosynthetischen Lichtsammelkomplex 2^[10] sowie für die Strukturbestimmung von Wirkstoffen^[11] und kleinen Proteinen wie Kaliotoxin in seiner freien^[8] und gebundenen Form^[12] verwendet.

Lesage und Mitarbeiter demonstrierten vor kurzem, dass eine Variante des CHHC-Experiments, das J-CHHC-Experiment ($J = J$ -Kopplungs-übertragen),^[13] einen Nachteil des CHHC-Experiments effizient überwindet, nämlich die Tatsache, dass Kontakte zwischen Methylgruppen wegen des unvorteilhaften Polarisationstransfers für diese Gruppen (drei Kreuzpolarisationsschritte in der Sequenz) zu relativ schwachen Signalen führen. Unter Verwendung von skalaren statt dipolaren Polarisationstransfers können Methylgruppen effizient ausgewählt werden (Abbildung 1e), was zu einer verbesserten Bestimmung der wichtigen Abstandsbeschränkungen im hydrophoben Kern des Proteins führt.

Ein großer Nachteil des oben beschriebenen, Heteronuclei detektierenden Protonenkorrelationsexperiments ist seine geringe Empfindlichkeit. Dieses Problem kann durch die Verwendung von deuterierten Proteinen gelöst werden,

deren ^2H -Atome zum Teil wieder gegen ^1H -Atome zurückgetauscht wurden. Hier können Protonenabstände durch eine direkte Detektion in der Protonendimension bestimmt werden.^[4,14,15] Kürzlich gelang durch die Kombination von Verdünnung der ^1H -Atome mit ^2H -Atomen, hohen magnetischen Feldern, Hochfrequenzrotation der Probe und Dreifach-Resonanz-Experimenten die Protonendetektion in dem aus 55 Aminosäuren aufgebauten GB1-Protein mit hoher Auflösung und Empfindlichkeit.^[16] Heteronukleare 3D-Experimente liefern die nötige spektrale Auflösung zur Identifizierung von Kontaktten, besonders zwischen Amidprotonen, aber auch mit den austauschbaren Seitenkettenprotonen von Asparagin, Glutamin, Tryptophan und Threonin. Die Protonen detektierenden Experimente müssen Sequenzen zur Unterdrückung der Signale von Wasserprotonen enthalten. Dies ist momentan technisch schwieriger zu verwirklichen als bei der NMR-Spektroskopie in Lösung, wo Wassersignale routinemäßig mithilfe von Gradientenpulsen unterdrückt werden. Diese Ausstattung ist heutzutage nur in wenigen MAS-Festkörper-NMR-Sonden enthalten.^[5,17] Die Entwicklung alternativer Lösungen schreitet allerdings schnell voran.^[18] Ein Nachteil der Messungen von Abstandsbeschränkungen zwischen Protonen, die hauptsächlich von Amidbindungen stammen, ist die Tatsache, dass so das dichte Netzwerk zwischen Protonen in vollständig protonierten Proben nicht vorhanden ist (Abbildung 1 f). Dies bildet möglicherweise ein Hindernis für die Strukturbestimmung, z.B. in helicalen Proteinen. Außerdem können die Konformationen der Seitenketten mit diesem Ansatz nur schlecht bestimmt werden, und größere oder komplexere Moleküle könnten sich als schwer auflösbar herausstellen.

Die Messung von Abständen zwischen Kohlenstoffatomen in vollständig markierten Proteinproben galt wegen des Phänomens der Unterdrückung schwacher Kopplungen lange als sehr schwierig. Die ersten Hinweise,^[19,20] dass einfache Experimente mit protonengetriebener Spindiffusion weniger von diesem Phänomen betroffen sind als Rückkopplungsexperimente, wurden von Ernst und Mitarbeitern in theoretischen Arbeiten bestätigt.^[21] Tatsächlich beruht der Polarisationstransfer in protonengetriebenen Sequenzen auf einem Effekt zweiter Ordnung, der Kreuzterme zwischen zwei dipolaren Kopplungen involviert, die weniger empfindlich gegenüber der Unterdrückung schwacher dipolarer Kopplungen als die dipolaren Flip-Flop-Terme sind. Zu guter Letzt gelang der Nachweis, dass Messungen der C-C-Abstände an vollständig markierten Systemen durchgeführt werden können.^[22,23] Meier und Mitarbeiter bestimmten die Struktur von Ubiquitin mit einer DARR-Pulssequenz (DARR = dipolar-assisted rotational resonance), einer Variante der Experimente mit protonengetriebener Spindiffusion zur Messung von Abstandsbeschränkungen zwischen Kohlenstoffatomen. Die Abstandsmessungen bleiben allerdings aufgrund weitergegebener Magnetisierungstransfers unpräzise: Die Spektren enthalten sehr viele Signale, da alle intraresidualen und sequenziellen Kreuzsignale zusätzlich zu den Signalen sichtbar sind, die die gewünschten Informationen zu Kopplungen über große Entfernung liefern.

Ein interessanter Ansatz zur präziseren Abstandsmessung ist die Verwendung von Rückkopplungsmethoden, die se-

lektiv in Bezug auf die chemische Verschiebung sind. Selektive Rückkopplungsmethoden fanden bereits Anwendung für die Strukturbestimmung kleiner Moleküle mit aufgelösten chemischen Verschiebungen, indem ein Spinpaar^[24] oder eine bestimmte dipolare Wechselwirkung^[25] pro Experiment rückgekoppelt wurde. Dies kann bei großen Proteinen mühsam sein. Mehrfachmessungen zur Bestimmung von Abstandsbeschränkungen zwischen Stickstoff- und Kohlenstoffspins können mithilfe von Varianten des TEDOR-Experiments^[26,27] durchgeführt werden; sie wurden zur Bestimmung der Struktur des amyloidogenen Proteins Transthyretin verwendet.^[28] Um den Messaufwand zu reduzieren, führten Laidzhansky und Mitarbeiter ein Experiment ein, das die Abstände zwischen mehreren Carbonyl- und Seitenketten-Kohlenstoffatomen präzise messen kann (Abbildung 1 c).^[29] Die zugrunde liegenden 3D-Experimente umfassen den Polarisationstransfer von N- zu C_{Carbonyl}-Spins und führen zu einer zweidimensionalen N-C'-Korrelationskarte, die den Großteil der Spins im untersuchten, 55 Aminosäuren langen GB1-Protein auflöst. Dem folgt ein selektiver Transfer zu den Seitenketten- und C_{Carbonyl}-Spins mithilfe der Sequenz HBR² (homogeneously broadened version of R²). Verschiedene Rotationsfrequenzen werden nun verwendet, um eine Serie von Experimenten durchzuführen; die Abstandsinformationen werden aus der Abhängigkeit des Polarisationstransfers von der Rotationsfrequenz gewonnen.^[30] Anders als Rückkopplungsmethoden, die im Hinblick auf die chemische Verschiebung selektiv sind, kann die homogen verbreiterte Version ganze Bereiche in der chemischen Verschiebung rückkoppeln. So mit ist die Extraktion mehrerer Abstände mit einer Präzision möglich, die normalerweise besser als $\pm 1 \text{ \AA}$ ist. Ein geringfügiger Nachteil dieses Experimentes ist die Notwendigkeit, Spektren bei verschiedenen Rotationsfrequenzen aufzunehmen. Außerdem ist die Zahl von potenziell messbaren Abstandsbeschränkungen kleiner als für den Fall, dass Abstände zwischen allen Kohlenstoff- und Protonenspins ohne Einschränkungen gemessen werden können. Es muss bedacht werden, dass eine hohe Zahl an Abstandsbeschränkungen entscheidend für die hochauflösende Strukturbestimmung ist.

Eine neue Klasse von Kohlenstoffkorrelationsexperimenten wurde kürzlich von Griffin und Mitarbeitern entwickelt.^[31] In diesen Experimenten werden C/N-Spinwechselwirkungen durch einen dritten Spin vermittelt, normalerweise einen nahen Protonenspin, der räumlich günstig zu den beiden anderen Spins positioniert sein muss. Die Abhängigkeit von der Position des Protonen-„Helfer“-Spins führt dazu, dass direkt benachbarte Kohlenstoffspins ungünstige Rückkopplungsbedingungen aufweisen und dass Transfers über große Entfernungen begünstigt sind, da hier die Wahrscheinlichkeit größer ist, dass sich zwischen den beiden Kohlenstoffspins ein Protonenspin befindet. Die resultierenden Spektren sind daher weniger durch intraresiduale und sequenzielle Transfers kontaminiert als traditionelle Kohlenstoffkorrelationspektren wie DARR und PDS (proton-driven spin diffusion), und die interessanten Informationen zu Wechselwirkungen über große Entfernungen sind einfacher zugänglich.

Winkelmessungen sind für die Proteinstrukturbestimmung komplementär zu Abstandsmessungen. Die Einfüh-

nung von Diederwinkelbeschränkungen, die aus der Information über die chemische Verschiebung vorhergesagt werden können, ist in der NMR-Spektroskopie weit verbreitet.^[34] Rienstra und Mitarbeiter zeigten, dass die Einführung von Vektorwinkelbeschränkungen die Qualität von Strukturen stark verbessern kann.^[35] Diese Beschränkungen definieren die relative Orientierung der dipolaren Vektoren ^1H - ^{15}N und ^1H - ^{13}C und können durch dipolare Verschiebung zugänglich gemacht werden. Die kombinierte Verwendung mit H- und ^{13}C -Abstandsbeschränkungen aus CHHC- und DARR-Spektren ermöglichte die hochpräzise Bestimmung der GB1-Struktur auf atomarem Niveau.

NMR-spektroskopische Methoden haben in den letzten Jahren eine beachtliche Entwicklung erfahren; mittlerweile gibt es eine Fülle von Ansätzen, die die Bestimmung von Abstandsbeschränkungen in vollständig markierten Proteinen ermöglichen. Der neueste Meilenstein auf diesem Gebiet ist die Bestimmung der hochauflösten dreidimensionalen Struktur eines Prionenproteins durch Festkörper-NMR-Spektroskopie, die Meier und Mitarbeitern gelang. Sie verwendeten eine Kombination einiger der oben diskutierten Ansätze, um die Struktur des C-terminalen Abschnittes des Het-s-Prionenproteins in seiner amyloiden Fibrillenform abzuleiten.^[36]

Für die meisten der hier erwähnten Proteine konnte die Abstandsinformation noch per Hand aus den Spektren gewonnen werden. Angesichts der Linienbreiten, die normalerweise bei Proteinproben in der Festkörper-NMR-Spektroskopie beobachtet werden (0.5–1 ppm), wird die manuelle Zuordnung mit steigender Zahl an Spins allerdings schnell schwierig. Wenn es gelingt, schmalere Linien zu erhalten, kann die Grenze der Probengröße nach oben verschoben werden, aber ab einem bestimmten Punkt wird die manuelle Zuordnung auch dann schwierig bis unmöglich. Zweideutigkeiten bei der Zuordnung der Kreuzsignale können, außer durch Homologiemodelle, auch mithilfe iterativer Zuordnungsmethoden geklärt werden,^[37] wie sie oft in Programmen wie ARIA oder ATNOS/CANDID implementiert sind.^[38] Diese Methoden berücksichtigen die Tatsache, dass die meisten Kreuzsignale mehrere Zuordnungsmöglichkeiten haben, indem sie die unwahrscheinlichste Variante der Strukturmodelle, die iterativ anhand der verschiedenen möglichen Beschränkungen erzeugt wurden, ausschließen. Durch enge Zusammenarbeit von Festkörper-NMR-Spektroskopikern mit den Entwicklern von Programmen für die NMR-Spektroskopie in Lösung konnten diese Methoden an die speziellen Bedürfnisse der Festkörper-NMR-Spektroskopie angepasst werden. In ARIA ist mittlerweile die Eingabe der Kreuzsignale aus CHHC/NHHN-Spektren (NHHN-Experiment = protonenvermitteltes, Stickstoff detektierendes Korrelationsexperiment) möglich, die Beschränkungen der Abstände zwischen Protonen (aber mit chemischen Kohlenstoff/Stickstoff-Verschiebungen) oder Beschränkungen der Abstände zwischen Kohlenstoff- und Stickstoffatomen enthalten. Dieser Ansatz hat zur Bestimmung der hochauflösten Struktur des Crh-Dimers geführt (Abbildung 3).^[32] Die Information, die in der Schachbrettmarkierung enthalten ist, wurde in das Programm SOLARIA^[39] eingeführt, und die Abstandskalibrierung, die den schnellen

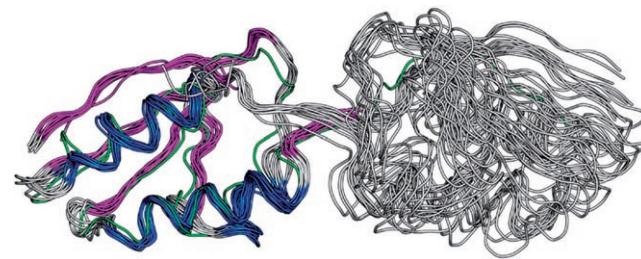


Abbildung 3. Strukturbündel der zehn energetisch günstigsten Strukturen des mikrokristallinen $2 \times 10.4\text{-kDa-Crh-Proteins}$, bestimmt durch CHHC- und NHHC-Festkörper-NMR-Experimente.^[32] Die Strukturen sind in einem der beiden Monomere überlagert, und die Kristallstruktur^[33] ist in Grün gezeigt.

Polarisationstransfer entlang der direkten Bindungen berücksichtigt, in ATNOS/CANDID^[23] einbezogen.

Die Entwicklung komplementärer Verfahren zur Messung und Zuordnung von Abstandsbeschränkungen hat zur Bestimmung einer Reihe hochauflöster Proteinstrukturen mithilfe der Festkörper-NMR-Spektroskopie geführt, mit einer Präzision, die sich derjenigen der NMR-Spektroskopie in Lösung annähert. Die Festkörper-NMR-Spektroskopie ist nun so ausgereift, dass Probleme in der Strukturbiologie angegangen werden können, die außerhalb der Reichweite von Techniken wie der Röntgenkristallographie und der NMR-Spektroskopie in Lösung liegen.

Online veröffentlicht am 4. Juli 2008

- [1] H. M. Berman, K. Henrick, H. Nakamura, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 980.
- [2] F. Castellani, B. van Rossum, A. Diehl, M. Schubert, K. Rehbein, H. Oschkinat, *Nature* **2002**, *420*, 98.
- [3] A. E. McDermott, F. J. Creuzet, A. C. Kolbert, R. G. Griffin, *J. Magn. Reson.* **1992**, *98*, 408.
- [4] B. Reif, C. P. Jaroniec, C. M. Rienstra, M. Hohwy, R. G. Griffin, *J. Magn. Reson.* **2001**, *151*, 320.
- [5] V. Chevelkov, B. J. van Rossum, F. Castellani, K. Rehbein, A. Diehl, M. Hohwy, S. Steuernagel, F. Engelke, H. Oschkinat, B. Reif, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7788.
- [6] E. K. Paulson, C. R. Morcombe, V. Gaponenko, B. Dancheck, R. A. Byrd, K. W. Zilm, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15831.
- [7] A. Lange, S. Luca, M. Baldus, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9704.
- [8] A. Lange, S. Becker, K. Seidel, K. Giller, O. Pongs, M. Baldus, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2125; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2089.
- [9] C. Gardiennet, A. Loquet, M. Etzkorn, H. Heise, M. Baldus, A. Böckmann, *J. Biomol. NMR* **2008**, *40*, 239–250.
- [10] S. Ganapathy, A. J. van Gammeren, F. B. Hulsbergen, H. J. de Groot, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1504.
- [11] A. Lange, T. Schupp, F. Petersen, T. Carlomagno, M. Baldus, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 522.
- [12] A. Lange, K. Giller, S. Hornig, M. F. Martin-Eauclaire, O. Pongs, S. Becker, M. Baldus, *Nature* **2006**, *440*, 959.
- [13] A. Loquet, S. Laage, C. Gardiennet, B. Elena, L. Emsley, A. Böckmann, A. Lesage, *J. Am. Chem. Soc.*, im Druck.
- [14] B. Reif, B. J. Van Rossum, F. Castellani, K. Rehbein, A. Diehl, H. Oschkinat, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1488.
- [15] E. K. Paulson, C. R. Morcombe, V. Gaponenko, B. Dancheck, R. A. Byrd, K. W. Zilm, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14222.

- [16] D. H. Zhou, J. J. Shea, A. J. Nieuwkoop, W. T. Franks, B. J. Wylie, C. Mullen, D. Sandoz, C. M. Rienstra, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8532; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8380.
- [17] P. Charmont, A. Lesage, S. Steuernagel, F. Engelke, L. Emsley, *J. Magn. Reson.* **2000**, *145*, 334.
- [18] D. H. Zhou, C. M. Rienstra, *J. Magn. Reson.* **2008**, *192*, 167–172.
- [19] E. Crocker, A. B. Patel, M. Eilers, S. Jayaraman, E. Getmanova, P. J. Reeves, M. Ziliox, H. G. Khorana, M. Sheves, S. O. J. Smith, *J. Biomol. NMR* **2004**, *29*, 11.
- [20] D. Marulanda, M. L. Tasayco, M. Cataldi, V. Arriaran, T. Pole-nova, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 18135.
- [21] A. Grommek, B. H. Meier, M. Ernst, *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *427*, 404.
- [22] A. Egawa, T. Fujiwara, T. Mizoguchi, Y. Kakitani, Y. Koyama, H. Akutsu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 790.
- [23] T. Manolikas, T. Herrmann, B. H. Meier, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3959–3966.
- [24] C. M. Rienstra, L. Tucker-Kellogg, C. P. Jaroniec, M. Hohwy, B. Reif, M. T. McMahon, B. Tidor, T. Lozano-Perez, R. G. Griffin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 10260.
- [25] K. Nomura, K. Takegoshi, T. Terao, K. Uchida, M. Kainosh, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4064.
- [26] C. P. Jaroniec, C. Filip, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10728.
- [27] J. J. Helmus, P. S. Nadaud, N. Höfer, C. P. Jaroniec, *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 052314.
- [28] C. P. Jaroniec, C. E. MacPhee, V. S. Bajaj, M. T. McMahon, C. M. Dobson, R. G. Griffin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 711.
- [29] R. Janik, X. Peng, V. Ladizhansky, *J. Magn. Reson.* **2007**, *188*, 129.
- [30] X. Peng, D. Libich, R. Janik, G. Harauz, V. Ladizhansky, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 359.
- [31] J. R. Lewandowski, G. De Paepe, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 728.
- [32] A. Loquet, B. Bardiaux, C. Gardiennet, C. Blanchet, M. Baldus, M. Nilges, T. Malliavin, A. Böckmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3579.
- [33] M. Juy, F. Penin, A. Favier, A. Galinier, R. Montserret, R. Haser, J. Deutscher, A. Böckmann, *J. Mol. Biol.* **2003**, *332*, 767.
- [34] G. Cornilescu, F. Delaglio, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 289.
- [35] W. T. Franks, B. J. Wylie, H. L. F. Schmidt, A. J. Nieuwkoop, R.-M. Mayrhofer, G. J. Shah, D. T. Graesser, C. M. Rienstra, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 4621.
- [36] C. Wasmer, A. Lange, H. V. Melckebeke, A. B. Siemer, R. Riek, B. H. Meier, *Science* **2008**, *319*, 1523.
- [37] M. Nilges, *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 645.
- [38] ARIA: <http://aria.pasteur.fr/>; ATNOS/CANDID: http://www.biol.ethz.ch/IMB/groups/wuthrich_group/wu_people/torstenh/software/CANDID..
- [39] M. Fossi, F. Castellani, M. Nilges, H. Oschkinat, B. J. van Rossum, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6307; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6151.