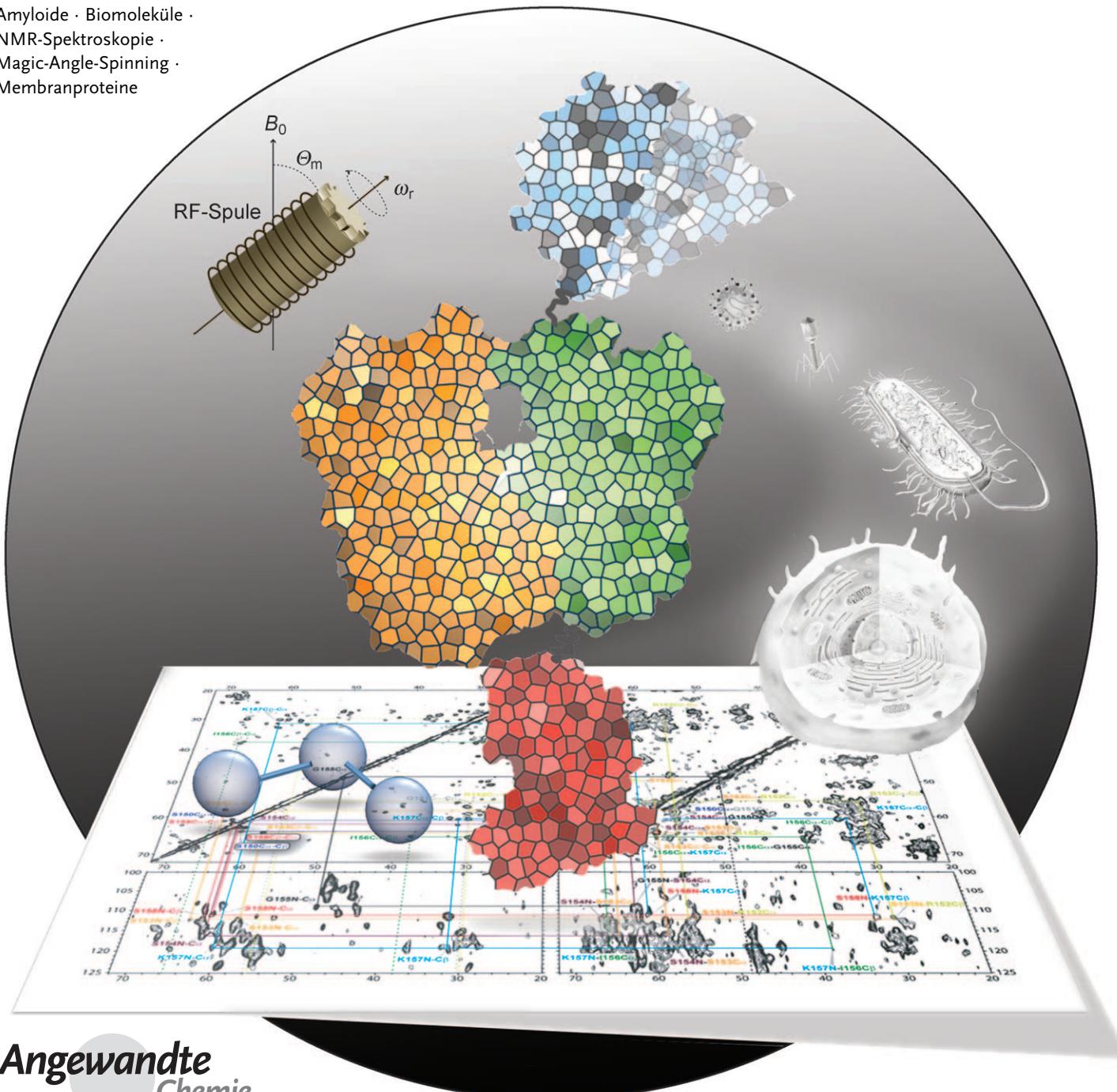


Festkörper-NMR-Spektroskopie an komplexen Biomolekülen

Marie Renault, Abhishek Cukkemane und Marc Baldus*

Stichwörter:

Amyloide · Biomoleküle ·
NMR-Spektroskopie ·
Magic-Angle-Spinning ·
Membranproteine



**Angewandte
Chemie**

Biomolekulare Anwendungen der NMR-Spektroskopie werden oft mit löslichen Molekülen oder Magnetresonanztomographie in Verbindung gebracht. Seit Ende der 70er Jahre liefert darüber hinaus die Festkörper-NMR-Spektroskopie (FK-NMR) auf atomarer Ebene Einblicke in komplexe biomolekulare Systeme von Lipid-Doppelschichten bis hin zu Biomaterialien. Im letzten Jahrzehnt haben Fortschritte im Bereich der NMR-Spektroskopie, der Biophysik und der Molekularbiologie das Repertoire der FK-NMR-Spektroskopie für biomolekulare Studien erheblich erweitert. Dieser Aufsatz behandelt neueste Ansätze und deren methodische Herausforderungen und diskutiert Fortschritte bei der Anwendung der FK-NMR-Spektroskopie im Grenzgebiet von Struktur- und Zellbiologie.

1. Einleitung

Die Strukturbestimmung von Molekülen durch Röntgenbeugung und NMR-Spektroskopie hat unsere Sichtweise von chemischen und biologischen Prozessen enorm beeinflusst, vor allem auch in der medizinischen Forschung.^[1] Entsprechende Studien greifen gewöhnlich auf einen reduktionistischen Ansatz zurück, indem molekulare Einheiten von ihrer natürlichen Umgebung getrennt werden. Jedoch wissen wir heute, dass bei fast allen physiologischen Prozessen Wechselwirkungen zwischen Molekülen innerhalb funktionaler Module auf verschiedenen räumlichen und zeitlichen Skalen beteiligt sind.

Im biologischen Kontext liefern zunehmend genauere Daten über genetische, physikalische und funktionelle Zusammenhänge genaue Einblicke in eine höhere Ebene der molekularen Organisation, bei der zeitliche und räumliche Wechselwirkungen molekularer Bausteine eine wichtige Rolle spielen.^[2] Zum Beispiel finden zelluläre Reaktionen auf äußere Reize (Licht, Nährstoffe) oder der Prozess der Proteinaggregation (Alzheimer, Parkinson) in weit komplexeren zellulären Umgebungen statt, als bisher angenommen wurde. Um diese Prozesse auf atomarer Ebene zu verstehen und sie in einem pharmakologischen Sinne zu beeinflussen, sind Strukturbestimmungsmethoden, die in komplexer molekularer Umgebung verwendet werden können, von beträchtlichem Wert.

Vor mehr als 30 Jahren wurde das Potenzial der FK-NMR-Spektroskopie als eine für solche Zwecke geeignete spektroskopische Methode erstmals deutlich. Erste Anwendungen galten heterogenen Biomolekülen wie Collagen,^[3] Knochen,^[4] Nukleoprotein-Komplexen^[5,6] oder Proteingelen.^[7] Auch wurden Lipid-Doppelschichten^[8] und Membranproteine (MP)^[9] früh mit FK-NMR-Spektroskopie untersucht. In den folgenden Jahren gab es weitere Fortschritte in der FK-NMR-Spektroskopie, und die NMR-Spektroskopie an löslichen Molekülen erfuhr revolutionäre Entwicklungen wie die Einführung der mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie^[10] und von Methoden zur Bestimmung von 3D-Strukturen^[11] sowie die weite Verbreitung der Isotopenmarkierungstechniken.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	8525
2. Methodische Herausforderungen	8526
3. Anwendungen	8530
4. Zusammenfassung und Ausblick	8532

Seit der Einführung geeigneter Hochfeldgeräte Ende der 90er Jahre bieten solche Entwicklungen nunmehr auch neue Möglichkeiten für die FK-NMR-Spektroskopie. Gleichzeitig

dazu erweitern Fortschritte im Bereich der Mikroskopie^[12] oder in Gebieten wie der theoretischen Chemie, dem Molecular Modeling und der Biophysik generell die Anwendbarkeit der FK-NMR-Spektroskopie an komplexen Molekülen. Dank dieser Entwicklungen bietet die NMR-Spektroskopie heute Möglichkeiten, im Grenzgebiet zwischen der klassischen Strukturbioologie (einschließlich Röntgen- oder Elektronenkrystallographie) und Bildgebungsmethoden wie Röntgen- und Elektronenkomputertomographie und Lichtmikroskopie zu arbeiten (Abbildung 1).

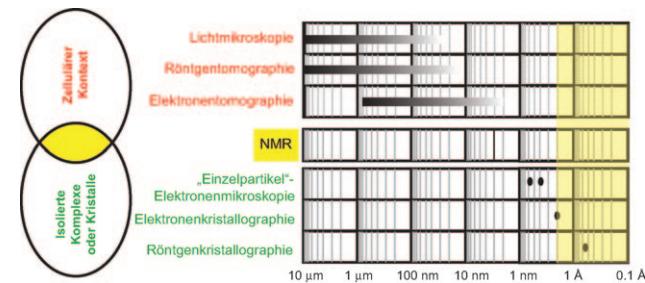


Abbildung 1. Die FK-NMR-Spektroskopie kann an der Schnittstelle (angedeutet durch gelbe Streifen) zwischen konventioneller Strukturbioologie an isolierten Komplexen oder Kristallen (grün) und zellulären Bildgebungsmethoden (rot) eingesetzt werden. Balken und Punkte deuten typische bzw. maximale Strukturauflösungen der genannten Methoden an. Abdruck nach Lit. [12].

In den letzten Jahren haben insbesondere FK-NMR-Techniken mit Rotation um den magischen Winkel (MAS, magic angle spinning)^[13] große Fortschritte für Strukturuntersuchungen komplexer biologischer Systeme gemacht. In Anbetracht der Fülle von Arbeiten würde eine umfassende Diskussion der aktuellen FK-NMR-Forschung in einem bio-

[*] Dr. M. Renault, Dr. A. Cukkemane, Prof. Dr. M. Baldus
Bijvoet Center for Biomolecular Research, Utrecht University
Padualaan 8, 3584 CH Utrecht (Niederlande)
Fax: (+31) 30-253-7623
E-Mail: m.baldus@uu.nl

logischen oder materialwissenschaftlichen Kontext den Rahmen dieses Aufsatzes übersteigen. Wir beschränken uns daher auf FK-NMR-Konzepte für den Einsatz an komplexen Biomolekülen. Zunächst arbeiten wir dazu die Herausforderungen solcher Messungen heraus und berichten dann über neuere Anwendungen im Bereich von Amyloidproteinen und anderen Proteinaggregaten sowie membrangebundenen Proteinen und ganzen bakteriellen Zellen.

2. Methodische Herausforderungen

2.1. Präparative Aspekte

Viele der präparativen Methoden, die im Bereich der Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie für Anwendungen an großen Molekülen entwickelt wurden, sind auch für die FK-NMR-Spektroskopie von Nutzen. Besonders Fortschritte in der Biochemie und Molekularbiologie, vor allem in Verbindung mit Isotopenmarkierungstechniken und ganz allgemein bei der Probenpräparation von Biomolekülen, spielen auch im Bereich der FK-NMR-Spektroskopie eine wichtige Rolle.

Einer der wahrscheinlich ersten Ansätze zur FK-NMR-Spektroskopie an großen Molekülen beruhte auf der Anwendung spezieller Isotopenmarkierungstechniken. Rekombinante Proteine werden im Allgemeinen durch Expression in *E. coli* oder durch In-vitro-Transkription/Translation in zellfreien Expressionssystemen hergestellt. Damit kann die zur Strukturbestimmung notwendige Isotopenmarkierung an gewünschten Aminosäuretypen entweder einheitlich oder an speziellen Atompositionen erzielt werden.^[14]

Ein viel höherer Markierungsgrad lässt sich erreichen, wenn das Expressionsmedium Glucose oder Glucosederivate (Glycerin, Azetat, Pyruvat, Succinat) als einzige Kohlenstoffquelle sowie Ammoniumsalze (Chlorid, Nitrat, Sulfat) als einzige Stickstoffquelle enthält. Die Vielseitigkeit der Kohlenstoffverbindungen liegt in ihrer ursprünglichen Rolle als Energielieferanten der Zelle begründet. Neben der Energielieferung stellt die Glucose eine Reihe von Zwischenprodukten für die meisten der biochemischen Pfade bereit. Stellvertretend steht dafür der Glykolyse-Pfad, bei dem sechs Kohlenstoffatome der Glucose in zwei C₃-Moleküle 3-Phosphoglycerat und schließlich in Pyruvat umgewandelt werden. Die Umwandlung des Pyruvats zu Acetat verbindet direkt die Glykolyse mit dem Zitronensäurezyklus

(TCA-Zyklus). Beide Zyklen sind für den zellulären Gesamtenergiehaushalt zuständig. Wie im Folgenden erläutert wird, bieten alle Zwischenzustände dieser Pfade einen biochemischen Zugang zu speziellen ¹³C-Markierungen; allerdings müssen für die praktische Anwendung der jeweiligen Kohlenstoffquellen Kostenaspekte berücksichtigt werden.

Die einheitliche ¹³C, ¹⁵N-Markierung, auch als „global labeling“ bezeichnet, liefert den maximalen Satz an spektroskopischer Information aus einer einzigen Probe. Allerdings kann mit zunehmender Größe des Moleküls die spektrale Überlappung zum Problem werden. Das Problem kann sich verschärfen bei einer Häufung hydrophober Aminosäuren, wie es z. B. bei Membranproteinen oder beim Auftreten dominanter Sekundärstruktur motive der Fall ist. Solche Effekte führen zu weiteren spektroskopischen Mehrdeutigkeiten, die oftmals speziellere Proteinherstellungen durch spezifische oder selektive Markierung erfordern.

Setzt man hingegen markierte oder unmarkierte Aminosäuren vor der Zellinduzierung zu, so produzieren die Bakterien Proteine mit dem entsprechenden Aminosäure(AS)-Markierungsprofil.^[15,16] Eine selektive AS-Markierung kann deshalb nicht nur die spektrale Überlappung vermindern, sondern sie verbessert auch die Möglichkeiten, spezielle Proteintopologien oder Domänen im NMR-Spektrum sichtbar zu machen. Solche „vorwärtsgerichteten“ Markierungstechniken kommen z. B. bei Membranproteinen und anderen großen Biomolekülen (siehe z. B. Lit. [17] für frühere Anwendungen) häufig zum Einsatz.

Im nächsten Schritt kann eine positionsspezifische Markierung durch Substitution von einheitlich markierter Glucose durch [1,3-¹³C]-Glycerin oder [2-¹³C]-Glycerin im Minimalmedium erreicht werden. Dies führt zu einer charakteristischen Verteilung von ¹³C- und ¹²C-Isotopen in jeder Aminosäure.^[18] Durch die weitgehende Unterdrückung von skalaren ¹³C-¹³C-Kopplungen über eine chemische Bindung können solche Markierungsmuster eine bessere spektrale Auflösung liefern. Außerdem können sie die Sequenzzuordnung erleichtern, da für spezielle Aminosäuretypen charakteristische Kreuzpeakmuster entstehen.^[19] Ein weiteres Beispiel für die Erzeugung eines speziellen Musters von ¹³C-Markierungen innerhalb methylierter oder aromatischer Proteinreste ist der Einsatz von [1-¹³C]-Glucose^[20] als alleinige Kohlenstoffquelle. Alternativ dazu ist es auch möglich, Proteinvarianten zu erzeugen, in denen spezifisch ¹³C-anreicherte Spinpaare im Proteinrückgrat (¹³C'-¹³Ca-Paare)



Marie Renault studierte Biochemie an der Universität Toulouse und promovierte am IPBS Toulouse sowie bei Bruker Biospin, Frankreich. Nach der Promotion (2008) wechselte sie als Postdoc an die Universität Utrecht in die Gruppe von Marc Baldus. Ihre Forschungen gelten der strukturellen und funktionellen Charakterisierung von integralen Membranproteinen unter nativen Bedingungen.



Abhishek Cukkemane studierte Mikrobiologie an der Universität Pune (Indien) und promovierte am Forschungszentrum Jülich sowie an der Universität zu Köln (2007). Nach einem Postdoktorat in Jülich wechselte er 2009 an die Universität Utrecht. Seine Forschungen gelten der Anwendung NMR-spektroskopischer Methoden zur Aufklärung biochemischer und biophysikalischer Aspekte von Membranprotein-Ligand-Wechselwirkungen.

oder eine ^{13}C -Spinmarkierung an Methylgruppen durch [1,2- ^{13}C]-Pyruvat^[21] oder [3- ^{13}C]-Pyruvat^[22] erreicht wird. Solche Markierungsstrategien können eine wichtige Rolle bei der Bestimmung von strukturellen Kontakten (constraints) durch CC-, CHHC- oder verwandte Korrelationsmethoden spielen (siehe Übersichtsartikel in Lit. [23, 24]).

Eine weitere Methode – wenn auch noch nicht für FK-NMR-Spektroskopie gezeigt – ist die segmentbezogene Isotopenmarkierung, die den Proteinspleiß-Mechanismus nutzt.^[25] Alternativ dazu kann eine chemische Ligation zweier Polypeptidketten auch durch die Synthese eines N-terminalen Peptids mit einer Thioester-Endgruppe und einem C-terminalen Peptid mit einer Cysteingruppe erreicht werden.^[26]

Um intermolekulare Wechselwirkungen zu identifizieren, können Gemischtmarkierungsmethoden nötig sein, z. B. unter Verwendung von $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Mischungen.^[27] Die Proteingrenzfläche kann dann mithilfe von FK-NMR-Experimenten, die einen Magnetisierungstransfer zwischen ^{15}N und ^{13}C zulassen, untersucht werden. Mit zunehmender Molekülgröße kann die segmentbezogene Markierung, bei der nur ein Teil des Proteins anstelle des Volllängenproteins untersucht wird, eine weitere Option werden. Solche „divide-and-conquer“-Strategien wurden z. B. bei reassemblierten Proteinen^[28] und mehrdomänenigen Membranproteinen^[29] verwendet. Ein ähnliches Ergebnis kann durch enzymatisches Schneiden^[30] nach der Probenpräparation erreicht werden. In Abbildung 2 sind die verschiedenen Markierungstechniken dargestellt.

Neben dem maßgeschneiderten Einsatz der $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -Markierungsstrategien ist in der Vergangenheit die Technik der Probendeuterierung vielseitig eingesetzt worden. Seit den bahnbrechenden Arbeiten von Crespi und Katz^[31] in den 60er Jahren hat sich die Deuterierung, z. B. in Kombination mit speziell protonierten Methylgruppen,^[32] als wichtige Methode für biomolekulare Studien an löslichen und festen Biomolekülen erwiesen.^[33, 34] Dabei muss berücksichtigt werden, dass eine Deuterierung auch zu einer erheblichen Verminderung der Proteinexpression führen kann. Außerdem beeinflusst der Deuterierungsgrad NMR-relevante Parameter wie NMR-Frequenz, Relaxation oder Kreuzpolarisationseffizienz und beeinträchtigt die Möglichkeit, strukturrelevanten $^1\text{H}-^1\text{H}$ -Abstände zu messen. Diese Aspekte haben bisher den Einsatz in FK-NMR-Anwendungen gebremst. Jüngste Ergebnisse unserer Forschungsgruppe an einem membrangebundenen Ionenkanal (bislang unveröffentlicht) legen eine Kombination von partieller Deuterierung (bei der protonierte Vorstufen

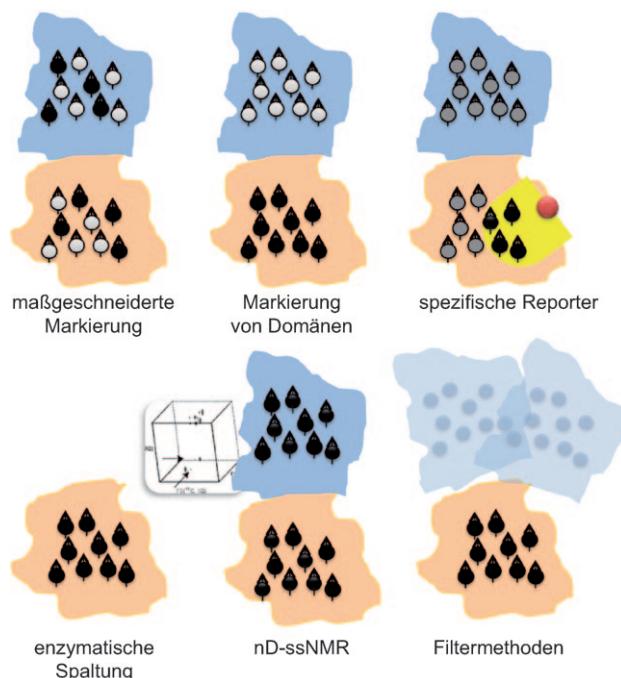


Abbildung 2. Präparative und NMR-Ansätze zur Verringerung der spektalen Komplexität bei FK-NMR-Anwendungen an großen Biomolekülen.

während der bakteriellen Expression eingesetzt werden), Ultrahochgeschwindigkeits-MAS und speziellen Mehrpulssequenzen nahe. Damit könnten zukünftige FK-NMR-Studien von der verbesserten ^1H -spektraler Auflösung profitieren, ohne die spektroskopische Detektion von strukturrelevanten Proton-Proton-Abständen entscheidend zu erschweren.

Nach Expression und Markierung stehen der FK-NMR-Spektroskopie im Prinzip alternative Methoden zu Probenpräparation zur Verfügung. Am häufigsten wurden Techniken verwendet, bei denen die Probenaufreinigung vor der FK-NMR-Messung stattfindet. Solche Aufreinigungen sind besonders anspruchsvoll im Zusammenhang mit Membranproteinen aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften. Protokolle unter Zuhilfenahme von Protein-Lyophilisierung (Gefriertrocknung) oder Ausfällung sind für FK-NMR-Studien etabliert. Für Membranproteine hat sich auch der Einsatz von Nanoscheibchen („nanodiscs“) als nützlich erwiesen.^[35]

Die bevorzugte Methode bei Membranproteinen ist aber die Proteinrekonstitution in Lipid-Doppelschichten. Im Falle von Membranproteinen in Lösungsmitteln geschieht der Einbau in Lipid-Doppelschichten spontan in Gegenwart von Liposomen, wenn die Lösungsmittelkonzentration verringert wird. Parameter wie die Lipidzusammensetzung, die Art der Salze, der pH-Wert und die Temperatur sowie die Anwesenheit eines endogenen Liganden können variiert werden, um einen funktionellen Einbau bei hohem Protein-Lipid-Verhältnis zu gewährleisten. Zelfreie Expressionssysteme bieten eine Alternative zur Herstellung von isotopenmarkierten Proben^[36] und wurden auch kürzlich in der FK-NMR-Spektroskopie verwendet.^[37] Dabei wird die Probenpräparation erheblich vereinfacht, da Membranproteine direkt in hydro-



Marc Baldus studierte Physik an der TU Darmstadt und der Universität Florida und promovierte an der ETH Zürich sowie der Universität Nijmegen (1996). Nach einem Postdoktorat am Massachusetts Institute of Technology und einer Tätigkeit als Privatdozent an der Universität Leiden wechselte er als Gruppenleiter an das Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen. Seit 2008 ist er Professor für Strukturbioologie an der Universität Utrecht. Seine Forschungen gelten der Ermittlung von Struktur-Funktions-Beziehungen komplexer Biomoleküle mittels NMR-Spektroskopie.

phobe Umgebungen wie Tensidmicellen und Lipidvesikel synthetisiert werden können. Aufreinigungs- und Rekonstitutionsprozeduren können schließlich komplett umgangen werden, wenn Zellextrakte oder komplette Zellen verwendet werden. In solchen Fällen müssen Vorkehrungen getroffen werden, die sicherstellen, dass die dominante Isotopenmarkierung das zu untersuchende Protein widerspiegelt. Die Qualität der Probe kann weiter verbessert werden, indem man die zelluläre Proteinsynthese während der Induktionsphase verhindert oder ganz unterdrückt. Durch T7-Vektor-systeme und Zugabe von Rifampicin zum Wachstumsmedium kann die *E. coli*-RNA-Polymerase selektiv inhibiert werden.^[38] Alternativ kann die Überexpression der mRNA-Interferase MazF, die einzelsträngige RNA bei ACA-Nukleotidsequenzen schneidet, zu einer deutlichen Verringerung des Proteinhintergrunds des Wirtsystems genutzt werden.

Dazu ist es notwendig, dass sowohl das gewünschte Gen als auch der Expressionsvektor ohne das ACA-Codon produziert werden. Diese Methode, die auch als Einzelproteinproduktion (SPP) bezeichnet wird,^[39] wurde kürzlich erfolgreich bei integralen Membranproteinen eingesetzt. Solche Ansätze sind besonders interessant, da durch die starke Unterdrückung der Proteinsynthese des Wirtsystems sowohl die Effizienz der Membranproteinexpression als auch das Targeting und die korrekte Insertion in die Wirtsmembran gesteigert werden.^[40] Dadurch eröffnen sich neue Möglichkeiten zur Strukturanalyse integraler Membranproteine durch FK-NMR-Spektroskopie. Des Weiteren könnten auch andere heterologe Expressionssysteme wie *Kluyveromyces lactis*,^[41] *Pichia pastoris*^[42] und andere Zelllinien wie Sf9-Insektenzellen^[43] oder Säugetier-Zelllinien wie CHO^[44] und HEK^[45] in Zukunft für NMR-Studien verwendet werden.

2.2. Empfindlichkeit und Auflösung

Die Intensität eines NMR-Signals ist proportional zum Besetzungsunterschied der Spinzustände, der durch die Boltzmann-Statistik definiert ist. Da sich die Spinzustände nur durch kleine Energiedifferenzen (im Radiofrequenzbereich) unterscheiden, ist auch der Besetzungsunterschied der Spinzustände klein. Im Vergleich zu anderen spektroskopischen Techniken wie EPR- und FTIR-Spektroskopie macht dieser Aspekt die FK-NMR-Spektroskopie zu einer relativ unempfindlichen Technik. Der Besetzungsunterschied erhöht sich mit der magnetischen Feldstärke (B_0), was einen der Vorteile von Hochfeld-NMR-Geräten erklärt. In der Praxis skaliert das Signal-Rausch-Verhältnis modernerer NMR-Spektrometern ungefähr mit $B_0^{1.5}$; dies ergibt einen Empfindlichkeitsgewinn von Faktor 2, wenn man ein 18.7-T-Spektrometer (800 MHz) mit einem 11.7-T-Spektrometer (500 MHz) vergleicht. Gleichzeitig verbessert sich die spektrale Auflösung, da Linienerweiterungen durch dipolare oder skalare Kopplungen nur durch Störungsterme höherer Ordnung auftreten. Diese Effekte und der Zugang zu entsprechenden Hochfeld-FK-NMR-Geräten haben in der Vergangenheit nicht nur die Forschung an mikrokristallinen Proteinen erleichtert, sondern verbessern auch die Möglichkeiten zu Studien an heterogenen Systemen. Als Beispiel illustriert

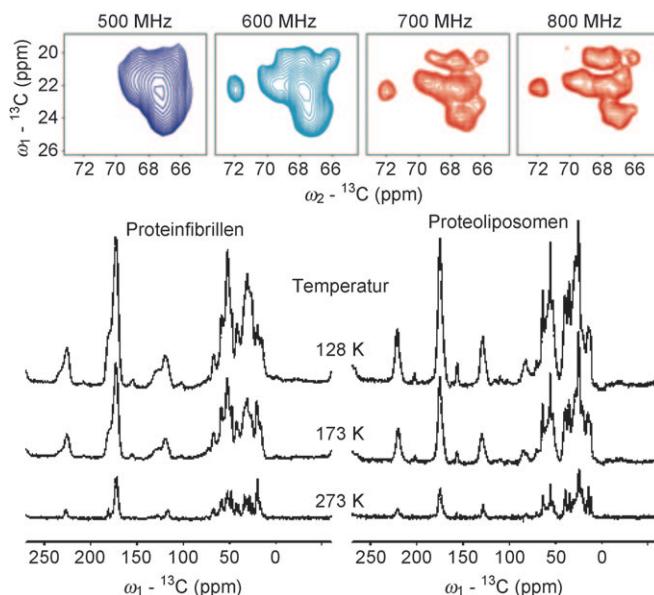


Abbildung 3. Oben: Gewinn an spektraler Auflösung beim Einsatz der Hochfeld-FK-NMR-Spektroskopie am Beispiel des Ionenkanals KcsA-Kv1.3. Unten: Signalverstärkung bei der biologischen FK-NMR-Spektroskopie durch Anwendung tiefer Temperaturen (unveröffentlicht).

Abbildung 3 die Vorteile der Hochfeld-NMR-Spektroskopie bei der Strukturbestimmung des membranständigen KcsA-Kv1.3-Kanals. Hier war die erreichte spektrale Auflösung entscheidend, um Sequenzzuordnungen zu erhalten.^[30]

Gemäß der Boltzmann-Gleichung vergrößert sich der Besetzungsunterschied auch, wenn man die Temperatur senkt (Stichwort Kryo-NMR-Spektroskopie). Bei 128 K erhöht sich z.B. die Empfindlichkeit um etwa den Faktor 3 gegenüber Experimenten bei 0°C (Abbildung 3, unten). Solche Empfindlichkeitsgewinne sind sowohl bei Proteinamyloiden als auch bei Proteoliposomen möglich. Wie aus Abbildung 3 ersichtlich ist, verringert sich dabei in der Regel die spektrale Auflösung, weshalb es bei zukünftigen Anwendungen wichtig sein wird, die spektrale Auflösung bei tiefer Temperatur zu kontrollieren (siehe unter anderem Lit. [46]).

Eine klassische Technik zur Verringerung von spektraler Komplexität ist die mehrdimensionale NMR-Spektroskopie.^[10] Auch im Bereich der FK-NMR-Spektroskopie wurden in den letzten Jahren zahlreiche mehrdimensionale Korrelationsexperimente entwickelt, die auch an Proteinen und anderen biomolekularen Systemen eingesetzt werden können (Abbildung 2). Solche Experimente korrelieren z.B. N-C-Umgebungen oder C-C-C-Spin-Netzwerke in drei^[47] oder sogar vier^[48,49] spektralen Dimensionen. Parallel dazu wurden auch alternative Sampling-Techniken untersucht, die die Experimentalzeit verkürzen oder die spektrale Dispersion ohne Verlust an spektraler Information modifizieren.^[50] Die spektrale Auflösung kann auch durch den Einsatz von Entkopplungssequenzen, die skalare oder dipolare Restkopplungen unterdrücken, verbessert werden. Solche Konzepte werden zunehmend verwendet, um komplexe Biomoleküle zu studieren (siehe auch Lit. [51]). Ein anderes Verfahren, um Strukturinformation in größeren Systemen zu erhalten, verwendet FK-NMR-Filtermethoden. Beispielsweise können

mithilfe molekularer Reporter, die sich durch spezielle NMR-Eigenschaften wie verringerte Relaxation, große natürliche Häufigkeit oder eine wohldefinierte Position auszeichnen (wie freies Wasser, paramagnetische Quencher oder Kerne der Lipidkopfgruppe), molekulare Grenzflächen untersucht werden (Abbildung 2). Eine frühe Technik verwendete den Magnetisierungstransfer zwischen Wasser- oder Lipid-Spins^[52] und wurde später auf mehrdimensionale FK-NMR-Spektroskopie ausgedehnt.^[53–55] Solche Methoden waren von beträchtlichem Nutzen im Zusammenhang mit membranassoziierten Peptiden und Proteinen (siehe auch Lit. [56]) und bieten auch neue Möglichkeiten, um Proteinaggregate wie Amyloide mittels Wasser^[57] oder paramagnetischer Relaxationsproben^[58,59] zu untersuchen.

Selbst ohne das Zufügen von speziellen Reportermolekülen können Unterschiede in den molekularen Beweglichkeiten zur Vereinfachung der spektroskopischen Analyse führen. In der Tat wird die FK-NMR-Spektroskopie seit einiger Zeit zur Untersuchung von molekularen Bewegungen in großen Molekülen verwendet.^[60] Solche Studien haben kürzlich die konformativen Bewegungen eines intakten Virus aufgeklärt^[61] oder wurden verwendet, um die molekulare Dynamik funktionell relevanter Membranproteinsegmente zu messen.^[62,63] Eine vollständige Diskussion dieser neu entwickelten Methoden und ihrer Anwendung auf mikrokristalline Proteine (siehe z.B. Lit. [64,65]) geht über den Rahmen dieses Aufsatzes hinaus. Oft kommen FK-NMR-Pulssequenzen zum Einsatz, die Veränderungen in spektroskopischen Parametern, insbesondere Relaxationszeiten wie T_1 , T_2 und $T_{1,\text{rho}}$ messen. Alternativ werden Polarisationstransferschritte eingebaut, die skalaren oder dipolaren Transfer verwenden (siehe z.B. Lit. [66]) und, im letzteren Fall, die durch Bewegung skalierte dipolare Kopplung von ^1H - ^{15}N -, ^1H - ^{13}C - und ^{13}C - ^{13}C -Spinpaaren messen. Generell spielen intermolekulare Wechselwirkungen eine herausragende Rolle im Festkörper.^[67] Strukturuntersuchungen an mikrokristallinen Proteinen oder Amyloidfibrillen verwendeten spezielle Markierungsmuster, die eine Separation des intra- und intermolekularen Polarisationstransfers^[67] sowie dessen Unterdrückung^[58] ermöglichen. Durch Mischen von verschiedenen markierten molekularen Spezies lassen sich dann intermolekulare Kontakte in der FK-NMR-Spektroskopie messen.^[27,68] Wie in der Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie sollten ^1H / ^2H -Austauschexperimente eine weitere Vereinfachung der spektralen Komplexität ermöglichen.

Die spektrale Empfindlichkeit ist von großer Bedeutung bei Anwendungen an komplexen Systemen. Ein reizvoller Ansatz verwendet NMR-Pulsfolgen in hoher Wiederholungsrate, wobei die Notwendigkeit von starken Radiofrequenzpulsen durch ultraschnelles MAS oder durch molekulare Verdünnung aufgehoben wird. Die Relaxationseigenschaften können darüber hinaus durch Einbau von paramagnetischen Kernen verbessert werden (siehe z.B. Lit. [59,69]). Die theoretische Untersuchung solcher molekularen „Sonden“, ihre Auswirkungen auf FK-NMR-Daten und deren strukturelle Interpretation stellt zurzeit ein wichtiges Forschungsgebiet dar. Der Nutzen solcher Methoden wurde bereits an Amyloidproteinen gezeigt.^[59] Selbst in Abwesenheit von Paramagneten können Unterschiede in der

Relaxation in biomolekularen Systemen unter MAS-Bedingungen^[70] zur Optimierung von mehrdimensionalen FK-NMR-Experimenten verwendet werden.^[71]

Eine bedeutend größere Signalverstärkung ist durch spezielle Methoden wie Photo-CIDNP (chemisch induzierte dynamische Kernpolarisation)^[72] oder durch den Einsatz von Parawasserstoff^[73] oder polarisierten Edelgasen wie Xenon möglich. Im Prinzip können solche Methoden auch bei FK-NMR-Experimenten an komplexen Biomolekülen (siehe z.B. Lit. [75]) eingesetzt werden. Eine besonders elegante und möglicherweise breit einsetzbare Methode ist die dynamische Kernpolarisation (DNP; dynamic nuclear polarization). DNP beruht auf der Erzeugung einer großen Spinpolarisation jenseits des thermischen Gleichgewichts, die zu den gewünschten NMR-detektierbaren Kernen transferiert wird.^[76] Durch Mikrowelleneinstrahlung bei tiefen Temperaturen wurden Signalverstärkungen mit einem Faktor größer 100 in der FK-NMR-Spektroskopie gemessen.^[77] Zur Polarisierung von Flüssigkeiten wurden Durchflussmethoden vorgeschlagen.^[78] Außerdem wurden Methoden entwickelt, die durch schnelles Aufwärmen von der festen in die flüssige Phase Signalverstärkungen im löslichen Zustand und für die Leibbildung ermöglichen.^[79]

Seit kurzem sind spezielle FK-NMR-DNP-Spektrometer, die Signalverstärkungen zwischen 20 und 100 routinemäßig erreichen, auch kommerziell erhältlich. Solche Verbesserungen sind, wie kürzlich durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt wurde (unveröffentlicht), auch im Falle von kompletten zellulären Proben möglich. Die breite Anwendung solcher Systeme wird ohne Zweifel zu weiteren Verbesserungen im Bereich der Probenpräparation führen. Außerdem wird die Entwicklung spezieller Polarisationsquellen zu einer weiteren Signalverbesserung führen,^[80] und der zielgerichtete Einbau endogener oder chemisch synthetisierter Radikale in der Nähe der gewünschten molekularen Umgebung wird neue Möglichkeiten für die FK-NMR-Spektroskopie bieten.

2.3. Integrierte Ansätze

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass komplexe 3D-Strukturen durch FK-NMR-Spektroskopie bestimmt werden können (siehe z.B. Lit. [24]) und dass FK-NMR-Spektroskopie molekulare Bewegung auf unterschiedlichen Zeitskalen messen kann (siehe z.B. Lit. [64]). Gleichzeitig liefern die klassischen Methoden der Strukturbioologie (Abbildung 1) faszinierende Einblicke in isolierte und lösliche biomolekulare Komplexe. Darüber hinaus wurden im Bereich Molecular Modeling bemerkenswerte Fortschritte bei der Strukturvorhersage erzielt.^[81] Zusammen mit dem zunehmenden Nutzen biophysikalischer Methoden wie Elektronenmikroskopie (EM), resonantem Energietransfer nach Förster (FRET) und FTIR-Spektroskopie deuten diese Entwicklungen darauf hin, dass zukünftige Anwendungen der FK-NMR-Spektroskopie von integrierten Konzepten profitieren werden, um anspruchsvolle Probleme an komplexen Biomolekülen zu untersuchen.

Bereits heute hat die mögliche Berechnung von NMR-Frequenzen durch Ab-initio-^[82,83] und Hybrid-Methoden

(siehe z. B. Lit. [84]) die Verwendung von isotropen und anisotropen chemischen Verschiebungen in der Flüssigkeits- und der FK-NMR-Spektroskopie verändert. Generell hängen chemische Verschiebungen von mehreren Faktoren wie Wasserstoffbrücken, elektrischen Feldeffekten, Ringströmen und den Rückgrat- und Seitenketten-Torsionswinkeln ab. Eine Reihe von NMR-Konzepten wurde entwickelt, um Proteinstrukturen zu untersuchen oder, im günstigsten Fall, die NMR-spektroskopische Bestimmung der 3D-Struktur zu unterstützen.^[29,85] Auf der anderen Seite bieten chemische Verschiebungen eine vielseitige Hilfe, um intermolekulare Wechselwirkungen in molekularen Kristallen^[83] oder in bestimmten Biomolekülen wie photosynthetischen Membranproteinen mit einer hohen Chromophordichte^[86] zu untersuchen. Unter solchen Bedingungen kann eine Kombination von Molecular Modeling und expliziter Berechnung chemischer Verschiebungen nötig sein, um verlässliche Struktur-Funktions-Beziehungen zu etablieren (siehe z. B. Lit. [87]).

Darüber hinaus kann die Kombination von Flüssigkeits- und FK-NMR-Daten eine schnelle Hilfe bieten, um die Strukturen von mehrdomänenigen Biomolekülen wie Proteinaggregaten oder Membranproteinen aufzulösen^[63,88–90] oder um verschiedene Beweglichkeitsbereiche zu untersuchen. Oft können auch Röntgenkristallographie und SAXS-Daten direkt mit FK-NMR-Ergebnissen verglichen werden (siehe Lit. [91]). Letztlich bietet das Repertoire an modernen biophysikalischen Methoden wie FTIR-,^[90] Raman-,^[92] Fluoreszenz-^[93,94] und massenspektrometrischen Methoden^[95] eine wichtige Referenz für FK-NMR-Studien an komplexen Biomolekülen.

In der Literatur finden sich in zunehmender Zahl Beispiele für die Kombination von FK-NMR-Experimenten mit theoretischen Verfahren wie molekulares Docking,^[96–98] In-silico-Modeling^[29] und Moleküldynamikstudien.^[99] Solche Strategien deuten darauf hin, dass viele zukünftige Anwendungen der FK-NMR-Spektroskopie an komplexen Systemen iterative Ansätze umfassen werden (Abbildung 4), in denen Strukturmodelle, die aus der NMR-Spektroskopie oder durch andere Methoden generiert wurden, mittels FK-NMR-Spektroskopie evaluiert werden. Dies schließt die in den Abschnitten 2.1 und 2.2 beschriebenen Verfahren zur Verfeinerung von Struktur-, Beweglichkeits- und – schlussendlich – Funktionalitätsanalysen in komplexen Umgebungen ein.

3. Anwendungen

3.1. Amyloide und andere Aggregate

Die FK-NMR-Spektroskopie hat sich zu einer führenden Methode zur Untersuchung von Amyloidfibrillen entwickelt.^[100,101] 3D-Strukturen wurden nicht nur für mehrere Amyloidproteine von mittlerer Größe erhalten, sondern hochauflöste FK-NMR-Spektroskopie war auch möglich in erheblich größeren Proteinen wie α -Synuclein^[102] oder sogar im vollständigen Prion-Protein HET-s.^[103] Solche Studien verwendeten Pulssequenzen, die unterschiedliche Beweglichkeitsbereiche detektieren. Neben der Untersuchung von



Abbildung 4. Mögliche zukünftige, integrierte Ansätze für FK-NMR-Experimente an großen Biomolekülen.

Amyloidfibrillen wurde die FK-NMR-Spektroskopie auch zur Untersuchung von Aggregationsintermediaten eingesetzt. Neueste Studien^[104] haben Varianten des β -Amyloidpeptids und von α -Synuclein untersucht und liefern einen wichtigen Überblick über die Faltungslandschaft von Amyloiden und ähnlichen Proteinen. Ähnlich wie andere biophysikalische Studien können diese Experimente den Weg zu In-situ-Untersuchungen der Proteinfaltung und -aggregation mittels FK-NMR-Spektroskopie ebnen. Ein besonders interessanter Ansatz wurde von Tycko und Mitarbeitern beschrieben, die aus der Hirnmasse von Alzheimer-Patienten gezüchtete β -Amyloidfibrillen untersuchten.^[105]

Während solche FK-NMR-Studien auf die Krankheitsaspekte von Amyloidproteinen zielen, wird in zunehmendem Maße auch die funktionelle Rolle der „amyloiden“ Proteinfaltungen untersucht. Solche Zustände werden natürlicherweise bei Prionen^[101] und Proteinkomponenten der extrazellulären Matrix^[106] beobachtet. Darüber hinaus konnte mit Hilfe der FK-NMR-Spektroskopie kürzlich ein neuer Zusammenhang zu Proteinen der Kernpore hergestellt werden.^[93] Dabei zeigte sich, dass das 62 kDa große Kernporin Nsp1, das in vitro ein funktionelles Hydrogel bildet, durch Proteinsequenzen und Strukturmotive charakterisiert ist, die verwandt sind zu Amyloidproteinen. Auch hier zeigte die FK-NMR-Spektroskopie ihren vielseitigen Charakter, um sowohl strukturelle als auch dynamische Aspekte dieser Proteinaggregate zu untersuchen. Zudem konnte durch Entwicklung eines speziellen FK-NMR-Probenkopfes der Aggregationsprozess während der NMR-Aufnahme untersucht werden.^[93] Andere kürzlich publizierte FK-NMR-Studien an komplexen Biomolekülen untersuchten Aggregate des Capsidproteins von HIV-1,^[107] α B-Crystallin,^[88] Mikrotubuli^[89,108] und die Proteinbildung in Typ3-Proteinsekretionsmaschinen.^[90]

Natürlich ist die molekulare Organisation nicht auf Proteinnetzwerke beschränkt, sondern kann auch neuartige,

möglicherweise durch die Biologie inspirierte Materialien umfassen. Für solche Systeme trägt die Kombination von Methoden, die unterschiedliche Längenskalen erfassen (Röntgenkristallographie/EM und FK-NMR-Spektroskopie; Abbildung 1), bereits zu einer strukturbasierten Analyse funktioneller (Bio)materialien bei (siehe z. B. Lit. [109]).

3.2. Membranproteine

Membranproteine sind seit mehr als 30 Jahren Gegenstand der FK-NMR-Spektroskopie, mit bahnbrechenden Arbeiten an Bakteriorhodopsin (bR) oder Rhodopsin^[9,16,110] und Gramicidin.^[15] Neben diesen frühen Arbeiten^[6] wurden FK-NMR-Studien auch an membrangebundenen Hüllproteinen von filamentösen Bakteriophagen durchgeführt (siehe Lit. [111] für einen aktuellen Übersichtsartikel) und spielten eine wichtige Rolle bei der Erforschung antimikrobieller Peptide^[112,113] und im Bereich der Membranfusion.^[114]

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass die FK-NMR-Spektroskopie umfassende Informationen über größere Membranproteine liefern kann. Beispielsweise pendeln Retinalproteine nach Lichtaktivierung, die Konformationsänderungen im Protein und Chromophor verursacht, zwischen unterschiedlichen Zuständen. Im Fall des Rhodopsins konnten Topologie^[115] und Dynamik^[116] des Retinals sowie das Aktivierungsprofil des Rezeptors untersucht werden.^[45] Durch FK-NMR-Spektroskopie wurden auch unterschiedliche funktionelle Zustände von bR durch die Anwendung von dynamischer Kernpolarisation und Anregung durch Laserlicht untersucht.^[117] Beim Sensory Rhodopsin II wurden mittels FK-NMR-Spektroskopie die Rezeptortopologie, Komplexbildung und Aktivierung in natürlichen Membranen untersucht.^[55,63] Außerdem konnten neue Proteinfamilien mittels FK-NMR-Spektroskopie untersucht werden.^[118] Die Experimente zeigten, dass das Protein bereits im Grundzustand in unterschiedlichen Konformationen vorliegt.

Die FK-NMR-Spektroskopie spielte auch eine wichtige Rolle bei der Untersuchung des viralen M2-Kanals, sowohl bezüglich der Kanalstruktur und -dynamik^[119] als auch der Ligandenbindung.^[120] Zum Beispiel wird die FK-NMR-Spektroskopie seit geraumer Zeit für Untersuchungen der Ligandenbindung an funktionellen Membranproteinen eingesetzt. Solche Liganden, z. B. Spinnen- oder Skorpions Toxine, bieten eine wichtige Quelle für natürliche Wirkstoffe. Um eine gezielte Verbesserung der biologischen und therapeutischen Eigenschaften solcher Naturstoffe zu erzielen, ist ein Verständnis der Ligand-Protein-Wechselwirkung auf atomarer Ebene wichtig. Tatsächlich konnten für ein an einen Kaliumkanal gebundenes Toxin 3D-Strukturinformationen gewonnen werden.^[97] Verschiedene funktionelle und ligandgebundene Zustände von natürlichen und synthetischen Blockkern wurden mit FK-NMR-Spektroskopie untersucht.^[54,96,121] Weitere Untersuchungen von Ligand-MP-Wechselwirkungen wurden an anderen Ionenkanälen^[122] und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) durchgeführt.^[123]

Schließlich wurde eine ganze Reihe weiterer Membranproteine mit FK-NMR-Spektroskopie untersucht, darunter

membrangebundene Enzyme,^[49,98,124] Histidin-Kinasen,^[29] ABC-Transporter^[125] und Proteine der bakteriellen Außenmembran.^[126] Eine ausführliche Diskussion würde über den Umfang dieses Aufsatzes hinausgehen, wir verweisen deshalb auf aktuelle Übersichtsartikel zu diesen Themen.^[113,127]

3.3. Zellwände, Biomaterialien und mehr

Ein ultimatives Ziel der biomolekularen Spektroskopie und Mikroskopie ist es, eine Brücke zwischen der Struktur- und Zellbiologie zu schlagen. Die FK-NMR-Spektroskopie ist geeignet, atomare Auflösungen unter solchen In-situ-Bedingungen zu bieten – und sie hat dies seit mehr als zwei Jahrzehnten bewiesen.^[128] Im Folgenden behandeln wir neueste Anwendungen auf diesem Forschungsgebiet (Abbildung 5).

Die FK-NMR-Spektroskopie bietet die Möglichkeit, die biologische Struktur und zelluläre Organisation z. B. von Zellwänden in Bakterien, Pilzen und Pflanzen zu untersuchen. Tatsächlich wurden hochauflöste FK-NMR-Spektren an intakten Peptidoglycan-Sacculi von *E. coli* erhalten, die atompräzise Informationen über die Struktur und Dynamik des bakteriellen Peptidoglycans und seiner Wechselwirkung mit Proteinen mithilfe von 2D-Experimenten (die unter skalarer Kopplung aufgenommen wurden) lieferten.^[129] Seit der Entdeckung des Penicillins sind Antibiotika, die auf Peptidoglycane zielen, von großem wissenschaftlichen Interesse. Die FK-NMR-Spektroskopie wurde als eine Technik genutzt, um die Wirkungsweise solcher Antibiotika in intakten Zellen und Zellwandpräparationen pathogener Bakterien zu untersuchen. Dabei wurden z. B. intermolekulare dipolare Kopplungen unter MAS-Bedingungen gemessen.^[130] Die Tertiärstruktur des Peptidoglycans wurde durch FK-NMR-¹³C-Spindiffusionsexperimente untersucht,^[131] bei denen ein Magnetisierungstransfer von markierten Pentaglycalbrücken zum (nichtmarkierten) ¹³C der Hauptkette stattfindet. Ähnliche Ansätze wurden auch genutzt, um Virulenzfaktoren von markierten bakteriellen Lipopolysacchariden^[132] und Zellwandvorstufen in pilzständigen Pathogenen^[133] zu untersuchen. Die detaillierte Tertiärstruktur von Biopolymeren, insbesondere der pflanzlichen Zellwand, ist von großem Interesse in der Nahrungsmittelindustrie. Lösliche^[134] und unlösliche Extrakte^[135] pflanzlicher Biopolymere (mit Bedeutung für die Nährstoffspeicherung im Organismus) zeigen hoch dynamische und polymorphe Eigenschaften mit einer Vielzahl von Molekülen, die das Gewebe stabilisieren. Beispielsweise deckte dipolare 2D-Korrelationsspektroskopie^[136] ein beträchtliches Ausmaß an Polymorphie in der Struktur der Cellulose auf.

Die FK-NMR-Spektroskopie lieferte auch wichtige Beiträge zur atompräzisen Beschreibung der Zellwandstruktur von Diatomeen.^[94] Die silicatreichen Zellwände der Diatomeen werden durch spezielle Peptide in Form des Silaffins^[137] und Polyamins^[138] zusammengehalten. Ein genaues Verständnis der Zellwandstruktur solcher Kieselalgen könnte z. B. in der Nanotechnologie (Nanoelektronik) von Interesse sein. Die FK-NMR-Spektroskopie konnte darüber hinaus Strukturinformationen über Biomaterialien wie Apatite lie-

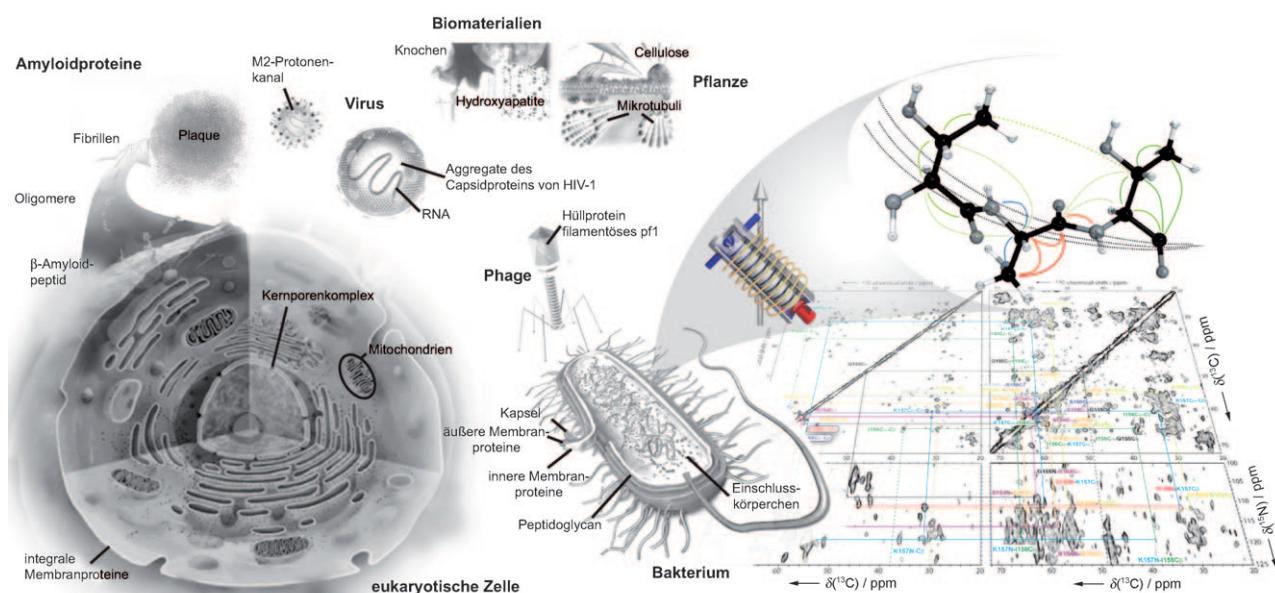


Abbildung 5. Die FK-NMR-Spektroskopie ist eine vielseitige Methode zur Untersuchung von komplexen Biomolekülen *in vitro* und, wie in mehreren der dargestellten Fälle gezeigt, unter *In-situ*-Bedingungen.

fern. Hier konnten ^1H - ^{31}P -HETCOR- und ^{15}N (^{31}P)-REDOR-Experimente den Anteil an Hydroxyionen in biologischen Apatitkristallen von Knochen bestimmen und molekulare Wechselwirkungen zwischen Speichelproteinen und der Oberfläche von Hydroxyapatit detektieren (siehe z.B. Lit. [139] für neuere Arbeiten).

Eine andere Forschungsrichtung sind zelluläre Organellen. Sivertsen et al. nahmen 2D- ^{15}N - ^{13}C -Korrelationspektren von Gasvesikeln der Cyanobakterien auf,^[140] die auf eine asymmetrische Dimer-Organisation der dominanten Proteinkomponente schließen lassen. ^{31}P -FK-NMR-Spektren wurden an Mitochondrien der Kartoffelknolle aufgenommen,^[141] um die Lipidzusammensetzung unter verschiedenen Stressbedingungen zu bestimmen. Schließlich lieferte die FK-NMR-Spektroskopie die erste atomare Beschreibung der molekularen Organisation von Einschlusskörperchen,^[142] und ihre spektroskopischen Prinzipien waren von großer Wichtigkeit bei der Metabolitbestimmung komplexer Biomoleküle.^[143]

4. Zusammenfassung und Ausblick

Seit mehr als drei Jahrzehnten liefert die FK-NMR-Spektroskopie Einblicke auf atomarer Ebene in die strukturelle Organisation komplexer Biomoleküle. Durch neueste Entwicklungen in der NMR-Spektroskopie, der Biophysik und verwandten Forschungsgebieten bietet die FK-NMR-Spektroskopie nun die Möglichkeit, komplexe zelluläre Systeme oder andere komplexe Systeme mit höchster (d.h. atomarer Präzision) zu untersuchen. Ein zentraler Aspekt der zellulären Funktion ist das abgestimmte Handeln wechselwirkender Proteine oder anderer Biomoleküle, die ihrerseits Komplexe und Netzwerke bilden können. Zum Beispiel deuten neueste Erkenntnisse darauf hin, dass

Moleküle an der Grenzfläche mehrerer molekularer Bereiche an der zellulären Biogenese teilnehmen. Bisher wurde die strukturelle Organisation solcher makromolekularer Einheiten durch die Kombination von Modellen der Ein-Partikel-EM, der zellulären Elektronenmikroskopie oder mithilfe von Röntgenkristallstrukturen von isolierten Proteinkristallen beschrieben (siehe z.B. Lit. [144]). Zukünftig könnte nun die FK-NMR-Spektroskopie die Möglichkeit bieten, strukturelle und dynamische Informationen direkt und *in situ* zu liefern.

Schon jetzt ist die FK-NMR-Spektroskopie die führende Technik zur Beschreibung der Amyloidaggregation und Fibrillenbildungen, da atomare Modelle der monomeren Untereinheiten ungeeignet oder nicht vorhanden sind. Selbst wenn Referenzinformation oder Strukturdaten in hoher Auflösung und von isolierten Untereinheiten vorhanden sind, könnten molekulare Anlagerungen oder funktionelle Aspekte eine strukturelle Umorganisation erfordern, wie kürzlich am Typ3-Sekretionssystem mittels FK-NMR-Spektroskopie nachgewiesen wurde.^[90] Solche Strukturänderungen in unterschiedlichen funktionellen Zuständen könnten zukünftig durch FK-NMR-Spektroskopie untersucht werden.

Studien zunehmend komplexer Systeme werden weitere Fortschritte bezüglich der spektroskopischen Empfindlichkeit und Auflösung erfordern. Insbesondere werden effiziente Signalverstärkungsmethoden, die bereits bei Amyloid- und Membranproteinen erfolgreich verwendet wurden, in einer zelluläreren Umgebung wichtig sein. Die Kombination von Isotopenmarkierung und paramagnetischer Markierung, die Einführung nichtnatürlicher Aminosäuren und der optimierte Einsatz von Polarisationsreagentien werden ebenfalls neue Möglichkeiten zum Studium komplexer Biomoleküle bieten. Parallel dazu werden Entwicklungen in der FK-NMR-Methodik und im Instrumentenbau die momentanen Grenzen der FK-NMR-Spektroskopie erweitern und helfen, die Lücke zwischen der Struktur- und Zellbiologie zu schließen.

Wir danken unseren Mitarbeitern und Kollegen für ihre Beiträge zu den aufgeführten Veröffentlichungen unserer Arbeitsgruppe. Diese Arbeiten wurden durch die DFG, die Max-Planck-Gesellschaft, die EU, die Volkswagenstiftung und die NWO gefördert. M.R. wird durch ein Postdoc-Stipendium des Marie-Curie-Trainingsnetzwerks „Structural Biology of Membrane Proteins“, SBMP (FP7-PEOPLE-2007-1-1-ITN), unterstützt.

Eingegangen am 10. Mai 2010,
veränderte Fassung am 22. Juli 2010
Online veröffentlicht am 12. Oktober 2010

- [1] W. C. Van Voorhis, W. G. J. Hol, P. J. Myler, L. J. Stewart, *PLoS Comput. Biol.* **2009**, *5*, e1000530.
- [2] R. G. Smock, L. M. Giersch, *Science* **2009**, *324*, 198.
- [3] D. A. Torchia, D. L. Vanderhart, *J. Mol. Biol.* **1976**, *104*, 315.
- [4] J. Herzfeld, A. Roufosse, R. A. Haberkorn, R. G. Griffin, M. J. Glimcher, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **1980**, *289*, 459.
- [5] M. G. Munowitz, C. M. Dobson, R. G. Griffin, S. C. Harrison, *J. Mol. Biol.* **1980**, *141*, 327.
- [6] S. J. Opella, T. A. Cross, J. A. Diverdi, C. F. Sturm, *Biophys. J.* **1980**, *32*, 531.
- [7] C. T. Noguchi, D. A. Torchia, A. N. Schechter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 4936.
- [8] J. Seelig, H. U. Gally, *Biochemistry* **1976**, *15*, 5199.
- [9] R. A. Kinsey, A. Kintanar, M. D. Tsai, R. L. Smith, N. Janes, E. Oldfield, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 4146.
- [10] R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, Clarendon, Oxford, **1987**.
- [11] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley-Interscience, New York, **1986**.
- [12] A. Leis, B. Rockel, L. Andrees, W. Baumeister, *Trends Biochem. Sci.* **2009**, *34*, 60.
- [13] E. R. Andrew, A. Bradbury, R. G. Eades, *Nature* **1958**, *182*, 1659.
- [14] S. Makino, M. Goren, B. Fox, J. Markley in *Methods Mol. Biol.*, Vol. 607 (Hrsg.: Y. Endo), Humana, Totowa, **2010**, S. 127.
- [15] W. Hu, K. C. Lee, T. A. Cross, *Biochemistry* **1993**, *32*, 7035.
- [16] R. A. Kinsey, A. Kintanar, E. Oldfield, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 9028.
- [17] L. W. Jelinski, D. A. Torchia, *J. Mol. Biol.* **1980**, *138*, 255; B. A. Lewis, G. S. Harbison, J. Herzfeld, R. G. Griffin, *Biochemistry* **1985**, *24*, 4671.
- [18] M. Hong, K. Jakes, *J. Biomol. NMR* **1999**, *14*, 71; D. M. LeMaster, D. M. Kushlan, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9255.
- [19] V. A. Higman, J. Flinders, M. Hiller, S. Jehle, S. Markovic, S. Fiedler, B. J. van Rossum, H. Oschkinat, *J. Biomol. NMR* **2009**, *44*, 245.
- [20] P. Lundström, K. Teilum, T. Carstensen, I. Bezsonova, S. Wiesner, D. F. Hansen, T. L. Religa, M. Akke, L. E. Kay, *J. Biomol. NMR* **2007**, *38*, 199.
- [21] C. Guo, C. Geng, V. Tugarinov, *J. Biomol. NMR* **2009**, *44*, 167.
- [22] A. L. Lee, J. L. Urbauer, A. J. Wand, *J. Biomol. NMR* **1997**, *9*, 437.
- [23] M. Baldus, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1204; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1186.
- [24] A. Böckmann, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6200; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6110.
- [25] A. Romanelli, A. Shekhtman, D. Cowburn, T. W. Muir, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 6397; H. Wu, M. Q. Xu, X. Q. Liu, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1998**, *1387*, 422.
- [26] F. I. Valiyaveetil, R. MacKinnon, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9113.
- [27] M. Etzkorn, A. Böckmann, A. Lange, M. Baldus, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14746.
- [28] J. Yang, S. Paramasivan, D. Marulanda, M. Cataidi, M. L. Tasayco, T. Polenova, *Magn. Reson. Chem.* **2007**, *45*, S73.
- [29] M. Etzkorn, H. Kneuper, P. Dunnwald, V. Vijayan, J. Kramer, C. Griesinger, S. Becker, G. Unden, M. Baldus, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 1031.
- [30] R. Schneider, C. Ader, A. Lange, K. Giller, S. Hornig, O. Pongs, S. Becker, M. Baldus, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7427.
- [31] H. L. Crespi, R. M. Rosenberg, J. J. Katz, *Science* **1968**, *161*, 795; S. Rokop, L. Gajda, S. Parmerter, H. L. Crespi, J. J. Katz, *Biochim. Biophys. Acta Enzymol.* **1969**, *191*, 707; H. H. Strain, H. L. Crespi, J. J. Katz, *Nature* **1959**, *184*, 730.
- [32] K. H. Gardner, L. E. Kay, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, *27*, 357.
- [33] A. E. McDermott, F. J. Creuzet, A. C. Kolbert, R. G. Griffin, *J. Magn. Reson.* **1992**, *98*, 408; M. Hologne, V. Chevelkov, B. Reif, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2006**, *48*, 211.
- [34] V. Tugarinov, V. Kanelis, L. E. Kay, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 749.
- [35] A. Z. Kijac, Y. Li, S. G. Sligar, C. M. Rienstra, *Biochemistry* **2007**, *46*, 13696.
- [36] F. Junge, B. Schneider, S. Reckel, D. Schwarz, V. Dötsch, F. Bernhard, *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 1729.
- [37] A. Abdine, M. A. Verhoeven, K. H. Park, A. Ghazi, E. Guittet, C. Berrier, C. Van Heijenoort, D. E. Warschawski, *J. Magn. Reson.* **2010**, *204*, 155.
- [38] E. A. Campbell, N. Korzheva, A. Mustaeve, K. Murakami, S. Nair, A. Goldfarb, S. A. Darst, *Cell* **2001**, *104*, 901.
- [39] M. Suzuki, L. Mao, M. Inouye, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1802.
- [40] L. Mao, Y. Tang, S. Vaiphei, T. Shimazu, S.-G. Kim, R. Mani, E. Fakhoury, E. White, G. Montelione, M. Inouye, *J. Struct. Funct. Genomics* **2009**, *10*, 281.
- [41] T. Sugiki, I. Shimada, H. Takahashi, *J. Biomol. NMR* **2008**, *42*, 159.
- [42] E. Böer, G. Steinborn, G. Kunze, G. Gellissen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *77*, 513.
- [43] D. R. Madden, M. Safferling, *Methods Mol. Biol.* **2007**, *363*, 39.
- [44] N. Armstrong, Y. Sun, G. Q. Chen, E. Gouaux, *Nature* **1998**, *395*, 913.
- [45] S. Ahuja, V. Hornak, E. C. Y. Yan, N. Syrett, J. A. Goncalves, A. Hirshfeld, M. Ziliox, T. P. Sakmar, M. Sheves, P. J. Reeves, S. O. Smith, M. Eilers, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 168.
- [46] V. S. Bajaj, P. C. A. van der Wel, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 118.
- [47] B. Q. Sun, C. M. Rienstra, P. R. Costa, J. R. Williamson, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8540.
- [48] W. T. Franks, K. D. Kloepper, B. J. Wylie, C. M. Rienstra, *J. Biomol. NMR* **2007**, *39*, 107.
- [49] Y. Li, D. A. Berthold, H. L. Frericks, R. B. Gennis, C. M. Rienstra, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 434.
- [50] N. S. Astrof, C. E. Lyon, R. G. Griffin, *J. Magn. Reson.* **2001**, *152*, 303; S. Luca, M. Baldus, *J. Magn. Reson.* **2002**, *159*, 243; A. T. Petkova, M. Baldus, M. Belenkay, M. Hong, R. G. Griffin, J. Herzfeld, *J. Magn. Reson.* **2003**, *160*, 1; H. Heise, K. Seidel, M. Etzkorn, S. Becker, M. Baldus, *J. Magn. Reson.* **2005**, *173*, 64; M. Weingarth, P. Tekely, R. Bruschweiler, G. Bodenhausen, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 952.
- [51] S. K. Straus, T. Bremi, R. R. Ernst, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *262*, 709; L. C. Shi, X. H. Peng, M. A. M. Ahmed, D. Edwards, L. S. Brown, V. Ladizhansky, *J. Biomol. NMR* **2008**, *41*, 9.
- [52] K. K. Kumashiro, K. Schmidt-Rohr, O. J. Murphy, K. L. Ouellette, W. A. Cramer, L. K. Thompson, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5043.
- [53] D. Huster, X. Yao, M. Hong, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 874.

- [54] C. Ader, R. Schneider, K. Seidel, M. Etzkorn, S. Becker, M. Baldus, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 170.
- [55] M. Etzkorn, S. Martell, O. C. Andronesi, K. Seidel, M. Engelhard, M. Baldus, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 463; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 459.
- [56] M. Hong, *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 176.
- [57] O. C. Andronesi, M. v. Bergen, J. Biernat, K. Seidel, C. Griesinger, E. Mandelkow, M. Baldus, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5922.
- [58] S. Balayssac, I. Bertini, A. Bhaumik, M. Lelli, C. Luchinat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 17284.
- [59] N. P. Wickramasinghe, S. Parthasarathy, C. R. Jones, C. Bhardwaj, F. Long, M. Kotecha, S. Mehboob, L. W. M. Fung, J. Past, A. Samoson, Y. Ishii, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 215.
- [60] D. A. Torchia, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1984**, *13*, 125.
- [61] J. L. Lorieau, L. A. Day, A. E. McDermott, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 10366.
- [62] C. Ader, O. Pongs, S. Becker, M. Baldus, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2010**, *1798*, 286.
- [63] M. Etzkorn, K. Seidel, L. Li, S. Martell, M. Geyer, M. Engelhard, M. Baldus, *Structure* **2010**, *18*, 293.
- [64] N. Giraud, A. Böckmann, A. Lesage, F. Penin, M. Blackledge, L. Emsley, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11422.
- [65] D. Reichert, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **2005**, *55*, 159.
- [66] O. C. Andronesi, S. Becker, K. Seidel, H. Heise, H. S. Young, M. Baldus, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12965.
- [67] M. Baldus, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 618.
- [68] C. Wasmer, A. Lange, H. Van Melckebeke, A. B. Siemer, R. Riek, B. H. Meier, *Science* **2008**, *319*, 1523.
- [69] I. Bertini, L. Emsley, M. Lelli, C. Luchinat, J. Mao, G. Pintacuda, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5558; R. Linser, V. Chevelkov, A. Diehl, B. Reif, *J. Magn. Reson.* **2007**, *189*, 209.
- [70] M. Giffard, M. Bardet, B. Bersch, J. Coves, S. Hediger, *J. Magn. Reson.* **2009**, *200*, 153.
- [71] J. J. Lopez, C. Kaiser, S. Asami, C. Glaubitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15970.
- [72] R. Kaptein in *Biological Magnetic Resonance* (Hrsg.: L. J. Berliner, J. Reuben), Plenum, New York, **1982**, S. 145.
- [73] R. W. Adams, J. A. Aguilar, K. D. Atkinson, M. J. Cowley, P. I. P. Elliott, S. B. Duckett, G. G. R. Green, I. G. Khazal, J. Lopez-Serrano, D. C. Williamson, *Science* **2009**, *323*, 1708.
- [74] A. Bifone, Y.-Q. Song, R. Seydoux, R. E. Taylor, B. M. Goodson, T. Pietrass, T. F. Budinger, G. Navon, A. Pines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 12932.
- [75] S. Prakash, Alia, P. Gast, H. J. M. de Groot, J. Matysik, G. Jeschke, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12794; M. G. Zysmilich, A. McDermott, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 6857.
- [76] A. W. Overhauser, *Phys. Rev.* **1953**, *92*, 411.
- [77] T. Maly, G. T. Debelouchina, V. S. Bajaj, K. N. Hu, C. G. Joo, M. L. Mak-Jurkauskas, J. R. Sirigiri, P. C. A. van der Wel, J. Herzfeld, R. J. Temkin, R. G. Griffin, *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 052211.
- [78] E. R. McCarney, B. D. Armstrong, M. D. Lingwood, S. Han, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 1754.
- [79] J. H. Ardenkjær-Larsen, B. Fridlund, A. Gram, G. Hansson, L. Hansson, M. H. Lerche, R. Servin, M. Thaning, K. Golman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 10158.
- [80] Y. Matsuki, T. Maly, O. Ouari, H. Karoui, F. Le Moigne, E. Rizzato, S. Lyubenova, J. Herzfeld, T. Prisner, P. Tordo, R. G. Griffin, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5096; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4996.
- [81] R. Das, D. Baker, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 363.
- [82] E. Oldfield, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **2005**, *360*, 1347.
- [83] J. R. Yates, C. J. Pickard, F. Mauri, *Phys. Rev. B* **2007**, *76*, 024401.
- [84] S. Neal, A. M. Nip, H. Y. Zhang, D. S. Wishart, *J. Biomol. NMR* **2003**, *26*, 215; Y. Shen, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **2007**, *38*, 289.
- [85] A. Cavalli, X. Salvatella, C. M. Dobson, M. Vendruscolo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 9615; Y. Shen, O. Lange, F. Delaglio, P. Rossi, J. M. Aramini, G. H. Liu, A. Eletsky, Y. B. Wu, K. K. Singarapu, A. Lemak, A. Ignatchenko, C. H. Arrowsmith, T. Szyperski, G. T. Montelione, D. Baker, A. Bax, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 4685; S. Raman, O. F. Lange, P. Rossi, M. Tyka, X. Wang, J. Aramini, G. H. Liu, T. A. Ramelot, A. Eletsky, T. Szyperski, M. A. Kennedy, J. Prestegard, G. T. Montelione, D. Baker, *Science* **2010**, *327*, 1014; A. Holt, L. Rougier, V. Reat, F. Jolibois, O. Saurel, J. Czaplicki, J. A. Killian, A. Milon, *Biophys. J.* **2010**, *98*, 1864.
- [86] A. Pandit, P. K. Wawrzyniak, A. J. van Gammeren, F. Buda, S. Ganapathy, H. J. M. de Groot, *Biochemistry* **2010**, *49*, 478.
- [87] P. K. Wawrzyniak, A. Alia, R. G. Schaap, M. M. Heemskerk, H. J. M. de Groot, F. Buda, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 6971.
- [88] S. Jehle, B. van Rossum, J. R. Stout, S. M. Noguchi, K. Falber, K. Rehbein, H. Oschkinat, R. E. Klevit, P. Rajagopal, *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 1481.
- [89] S. Sun, A. Siglin, J. C. Williams, T. Polenova, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10113.
- [90] O. Poyraz, H. Schmidt, K. Seidel, F. Delissen, C. Ader, H. Tenenboim, C. Goosmann, B. Laube, A. F. Thunemann, A. Zychlinsky, M. Baldus, A. Lange, C. Griesinger, M. Kolbe, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 788.
- [91] T. Jovanovic, A. E. McDermott, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13816.
- [92] M. A. Shaibat, L. B. Casabianca, D. Y. Siberio-Pérez, A. J. Matzger, Y. Ishii, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 4400.
- [93] C. Ader, S. Frey, W. Maas, H. B. Schmidt, D. Goerlich, M. Baldus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 6281.
- [94] E. Brunner, C. Gröger, K. Lutz, P. Richthammer, K. Spinde, M. Sumper, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *84*, 607.
- [95] J. Hoffmann, L. Aslimovska, C. Bamann, C. Glaubitz, E. Bamberg, B. Brutschy, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 3480.
- [96] C. Ader, R. Schneider, S. Hornig, P. Velisetty, E. M. Wilson, A. Lange, K. Giller, I. Ohmert, M. F. Martin-Eauclaire, D. Trauner, S. Becker, O. Pongs, M. Baldus, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 605.
- [97] A. Lange, K. Giller, S. Hornig, M.-F. Martin-Eauclaire, O. Pongs, S. Becker, M. Baldus, *Nature* **2006**, *440*, 959.
- [98] K. Seidel, O. C. Andronesi, J. Krebs, C. Griesinger, H. S. Young, S. Becker, M. Baldus, *Biochemistry* **2008**, *47*, 4369.
- [99] K. P. Ravindranathan, E. Gallicchio, R. A. Friesner, A. E. McDermott, R. M. Levy, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5786; U. Zachariae, R. Schneider, P. Velisetty, A. Lange, D. Seeliger, S. J. Wacker, Y. Karimi-Nejad, G. Vriend, S. Becker, O. Pongs, M. Baldus, B. L. de Groot, *Structure* **2008**, *16*, 747; A. Vogel, G. Reuther, M. B. Roark, K. T. Tan, H. Waldmann, S. E. Feller, D. Huster, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2010**, *1798*, 275.
- [100] R. Tycko, *Q. Rev. Biophys.* **2006**, *39*, 1; A. Lange, B. Meier, C. R. Chim. **2008**, *11*, 332.
- [101] A. Böckmann, B. Meier, *Prion* **2010**, *4*, 72.
- [102] H. Heise, W. Hoyer, S. Becker, O. C. Andronesi, D. Riedel, M. Baldus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 15871.
- [103] C. Wasmer, A. Schütz, A. Loquet, C. Buhtz, J. Greenwald, R. Riek, A. Böckmann, B. H. Meier, *J. Mol. Biol.* **2009**, *394*, 119.
- [104] S. Chimon, M. A. Shaibat, C. R. Jones, D. C. Calero, B. Aizezi, Y. Ishii, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 1157; D. P. Karpinar, M. B. G. Balija, S. Kugler, F. Opazo, N. Rezaei-Ghaleh, N. Wender, H. Y. Kim, G. Taschenberger, B. H. Falkenburger, H. Heise, A. Kumar, D. Riedel, L. Fichtner, A. Voigt, G. H. Braus, K. Giller, S. Becker, A. Herzig, M. Baldus, H. Jackle, S. Eimer, J. B. Schulz, C. Griesinger, M. Zweckstetter, *Embo J.* **2009**, *28*, 3256; H.-Y. Kim, M.-K. Cho, A. Kumar, E. Maier, C. Sieben-

- haar, S. Becker, C. O. Fernandez, H. A. Lashuel, R. Benz, A. Lange, M. Zweckstetter, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17482; M. Ahmed, J. Davis, D. Aucoin, T. Sato, S. Ahuja, S. Aimoto, J. I. Elliott, W. E. Van Nostrand, S. O. Smith, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 561.
- [105] A. K. Paravastu, I. Qahwash, R. D. Leapman, S. C. Meredith, R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 7443.
- [106] F. Shewmaker, R. P. McGlinchey, K. R. Thurber, P. McPhie, F. Dyda, R. Tycko, R. B. Wickner, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 25065.
- [107] B. Chen, R. Tycko, *Protein Sci.* **2010**, *19*, 716; Y. Han, J. Ahn, J. Concel, I.-J. L. Byeon, A. M. Gronenborn, J. Yang, T. Polenova, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1976.
- [108] A. Kumar, H. Heise, M. J. J. Blommers, P. Krastel, E. Schmitt, F. Petersen, E.-M. Mandelkow, T. Carlonmagno, C. Griesinger, M. Baldus, *Angew. Chem.* **2010**, DOI: 10.1002/ange.201001946; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, DOI: 10.1002/anie.201001946.
- [109] S. Ganapathy, S. Sengupta, P. K. Wawrzyniak, V. Huber, F. Buda, U. Baumeister, F. Würthner, H. J. M. de Groot, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 11472; V. Percec, M. Glodde, T. K. Bera, Y. Miura, I. Shiyanovskaya, K. D. Singer, V. S. K. Balagurusamy, P. A. Heiney, I. Schnell, A. Rapp, H.-W. Spiess, S. D. Hudson, H. Duan, *Nature* **2002**, *417*, 384.
- [110] A. F. Creemers, C. H. Klaassen, P. H. Bovee-Geurts, R. Kelle, U. Kragl, J. Raap, W. J. de Grip, J. Lugtenburg, H. J. de Groot, *Biochemistry* **1999**, *38*, 7195.
- [111] S. J. Opella, A. C. Zeri, S. H. Park, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2008**, *59*, 635.
- [112] E. S. Salnikov, A. J. Mason, B. Bechinger, *Biochimie* **2009**, *91*, 734; S. Bhattacharjya, A. Ramamoorthy, *FEBS J.* **2009**, *276*, 6465; E. Strandberg, P. Tremouilhac, P. Wadhwani, A. S. Ulrich, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2009**, *1788*, 1667.
- [113] M. Tang, M. Hong, *Mol. BioSyst.* **2009**, *5*, 317.
- [114] W. Qiang, Y. Sun, D. P. Weliky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 15314.
- [115] M. Carravetta, X. Zhao, O. G. Johannessen, W. C. Lai, M. A. Verhoeven, P. H. M. Bovee-Geurts, P. J. E. Verdegem, S. Kühne, H. Luthman, H. J. M. de Groot, W. J. deGrip, J. Lugtenburg, M. H. Levitt, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3948.
- [116] M. F. Brown, M. P. Heyn, C. Job, S. Kim, S. Moltke, K. Nakaniishi, A. A. Nevzorov, A. V. Struts, G. F. J. Salgado, I. Wallat, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2007**, *1768*, 2979.
- [117] M. L. Mak-Jurkauskas, V. S. Bajaj, M. K. Hornstein, M. Belenky, R. G. Griffin, J. Herzfeld, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 883; V. S. Bajaj, M. L. Mak-Jurkauskas, M. Belenky, J. Herzfeld, R. G. Griffin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 9244.
- [118] N. Pfleger, A. C. Wörner, J. Yang, S. Shastri, U. A. Hellmich, L. Aslimovska, M. S. M. Maier, C. Glaubitz, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2009**, *1787*, 697; L. C. Shi, M. A. M. Ahmed, W. R. Zhang, G. Whited, L. S. Brown, V. Ladizhansky, *J. Mol. Biol.* **2009**, *386*, 1078.
- [119] M. Yi, T. A. Cross, H.-X. Zhou, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 13311.
- [120] S. D. Cady, K. Schmidt-Rohr, J. Wang, C. S. Soto, W. F. DeGrado, M. Hong, *Nature* **2010**, *463*, 689.
- [121] C. Ader, R. Schneider, S. Hornig, P. Velisetty, V. Vardanyan, K. Giller, I. Ohmert, S. Becker, O. Pongs, M. Baldus, *EMBO J.* **2009**, *28*, 2825.
- [122] L. Krabben, B.-J. van Rossum, S. Jehle, E. Bocharov, E. N. Lyukmanova, A. A. Schulga, A. Arseniev, F. Hucho, H. Oschkinat, *J. Mol. Biol.* **2009**, *390*, 662.
- [123] S. Luca, J. F. White, A. K. Sohal, D. V. Filippov, J. H. van Boom, R. Grisshammer, M. Baldus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 10706; J. J. Lopez, A. K. Shukla, C. Reinhart, H. Schwalbe, H. Michel, C. Glaubitz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1692; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1668.
- [124] J. Zamoon, F. Nitu, C. Karim, D. D. Thomas, G. Veglia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 4747.
- [125] V. Lange, J. Becker-Baldus, B. Kunert, B. J. van Rossum, F. Casagrande, A. Engel, Y. Roske, F. M. Scheffel, E. Schneider, H. Oschkinat, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 547.
- [126] M. Hiller, V. A. Higman, S. Jehle, B.-J. van Rossum, W. Kühlbrandt, H. Oschkinat, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 408; R. Schneider, M. Etzkorn, K. Giller, V. Daebel, J. Eisfeld, M. Zweckstetter, C. Griesinger, S. Becker, A. Lange, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1926; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1882.
- [127] M. F. Brown, G. F. J. Salgado, A. V. Struts, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2010**, *1798*, 177; A. Ramamoorthy, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2009**, *35*, 201.
- [128] G. E. Wilson, G. S. Jacob, J. Schaefer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1985**, *126*, 1006; S. J. Opella, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1982**, *33*, 533.
- [129] T. Kern, S. Hediger, P. Müller, C. Giustini, B. Joris, C. Bougault, W. Vollmer, J.-P. Simorre, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5618.
- [130] S. J. Kim, J. Schaefer, *Biochemistry* **2008**, *47*, 10155; S. J. Kim, M. Singh, J. Schaefer, *J. Mol. Biol.* **2009**, *391*, 414; S. Sharif, S. J. Kim, H. Labischinski, J. Schaefer, *Biochemistry* **2009**, *48*, 3100.
- [131] S. Sharif, M. Singh, S. J. Kim, J. Schaefer, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7023.
- [132] W. Jachymek, T. Niedziela, C. Petersson, C. Lugowski, J. Czaja, L. Kenne, *Biochemistry* **1999**, *38*, 11788.
- [133] J. Zhong, S. Frases, H. Wang, A. Casadevall, R. E. Stark, *Biochemistry* **2008**, *47*, 4701.
- [134] M. Hedenstrom, S. Wiklund-Lindstrom, T. Oman, F. Lu, L. Gerber, P. Schatz, B. Sundberg, J. Ralph, *Mol. Plant* **2009**, *2*, 933.
- [135] F. Bertocchi, M. Paci, *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9317.
- [136] H. Kono, Y. Numata, *Polymer* **2004**, *45*, 4541.
- [137] N. Kröger, S. Lorenz, E. Brunner, M. Sumper, *Science* **2002**, *298*, 584.
- [138] M. Sumper, S. Lorenz, E. Brunner, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5350; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5192.
- [139] V. Raghunathan, J. M. Gibson, G. Goobes, J. M. Popham, E. A. Louie, P. S. Stayton, G. P. Drobny, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 9324; G. Cho, Y. Wu, J. L. Ackerman, *Science* **2003**, *300*, 1123.
- [140] A. C. Sivertsen, M. J. Bayro, M. Belenky, R. G. Griffin, J. Herzfeld, *J. Mol. Biol.* **2009**, *387*, 1032.
- [141] M. A. Sani, O. Keech, P. Gardestrom, E. J. Dufourc, G. Grobner, *FASEB J.* **2009**, *23*, 2872.
- [142] J. Curtis-Fisk, R. M. Spencer, D. P. Weliky, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12568; C. Wasmer, L. Benkemoun, R. Sabate, M. O. Steinmetz, B. Coulary-Salin, L. Wang, R. Riek, S. J. Sauer, B. H. Meier, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4952; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4858.
- [143] M. Coen, E. Holmes, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 9.
- [144] S. Kühner, V. van Noort, M. J. Betts, A. Leo-Macias, C. Batisse, M. Rode, T. Yamada, T. Maier, S. Bader, P. Beltran-Alvarez, D. Castano-Diez, W.-H. Chen, D. Devos, M. Güell, T. Norambuena, I. Racke, V. Rybin, A. Schmidt, E. Yus, R. Aebersold, R. Herrmann, B. Böttcher, A. S. Frangakis, R. B. Russell, L. Serrano, P. Bork, A.-C. Gavin, *Science* **2009**, *326*, 1235.