

Nachweis und Identifizierung von Protein-Phosphorylierungen in Histidinen mithilfe von HNP-Korrelationen**

Sebastian Himmel, Sebastian Wolff, Stefan Becker, Donghan Lee* und Christian Griesinger*

Zelluläre Prozesse und Kommunikationsvorgänge werden durch posttranskriptionale Modifikationen wie Proteinephosphorylierungen reguliert. Hierbei spielt die Phosphorylierung von Histidinresten eine sehr wichtige Rolle.^[1,2] Aufgrund der Instabilität der N-P-Bindung bei niedrigen pH-Werten und der beiden möglichen Phosphorylierungsstellen im Imidazolring ist die Histidinphosphorylierung trotz erheblicher Fortschritte bei der Entwicklung biophysikalischer Methoden, wie Kernresonanzspektroskopie (NMR) und Massenspektrometrie, am schwierigsten zu charakterisieren. Erst durch kürzlich erzielte Verbesserungen in der Probenvorbereitung für massenspektrometrische Analysen gelang es überhaupt, Phosphohistidine nachzuweisen.^[3-5] Trotz alledem liefert die Massenspektrometrie derzeit keine Informationen, mit deren Hilfe sich die Regiochemie der Histidinphosphorylierung aufklären ließe.

Nach wie vor ist eine genaue Identifizierung des phosphorylierten Stickstoffatoms ($\text{N}^{\delta 1}$ oder $\text{N}^{\varepsilon 2}$) im Imidazolring der Phosphohistidine sehr zeitintensiv, mit hohem experimentellen Aufwand verbunden oder noch nicht genügend ausgereift. In Massenspektren weist ein Massenverlust von 80 Da ($-\text{PO}_3\text{H}^-$) auf das Vorhandensein von Phosphohistidinen hin,^[4] ermöglicht aber keine Unterscheidung zwischen den beiden potenziell phosphorylierten Stickstoffatomen. Bei phosphorylierten Proteinen liefert der Vergleich von chemischen Verschiebungen für ^{31}P aus 1D-Spektren oder chemische Verschiebungen für ^{15}N aus 2D- ^1H , ^{15}N -Korrelationsspektren^[6-10] mit entsprechenden Referenzsubstanzen, beispielsweise chemisch phosphoryliertem Histidin, nur bedingt eindeutige Ergebnisse, selbst unter Bedingungen, bei denen das Protein denaturiert ist.^[11] Prinzipiell kann man die Regiochemie bestimmen, indem man die pH- und temperaturabhängigen Hydrolysegeschwindigkeiten der N-P-Bindung mit Werten für freie Phosphohistidine vergleicht.^[12,13] Allerdings können sich diese Hydrolysegeschwindigkeiten von

Phosphohistidinen in Proteinen aufgrund der chemischen Umgebung von denen freier Phosphohistidine unterscheiden.^[14] Außerdem erfordern der Nachweis des hydrolysierten Phosphats sowie dessen Präparation und Quantifizierung zusätzliche Experimente, z. B. eine chromatographische Auftrennung radioaktiv markierten Phosphats (^{32}P).^[14] Somit steht derzeit keine zuverlässige und schnelle analytische Methode zur Bestimmung der Regiochemie von phosphorylierten Histidinen zur Verfügung.

Für NMR-Spektroskopiker ist es naheliegend, phosphorylierte Stickstoffatome direkt mithilfe von ^{15}N , ^{31}P -Korrelationsspektren über skalare Kopplung ($^1\text{J}(\text{N}^{15}, \text{P}^{31})$) zu identifizieren und über unterschiedliche Korrelationsmuster die Regiochemie der Histidinphosphorylierung aufzuklären, ohne dabei auf die Interpretation chemischer Verschiebungen angewiesen zu sein. Die sequenzielle Zuordnung der Histidine kann über NOESY- oder CC-TOCSY-Experimente^[15] erfolgen. Während Experimente vom hier beschriebenen HNP-Typ für andere Kernkombinationen schon verwendet worden sind, ist das von uns vorgestellte Experiment bisher noch nicht in der Literatur beschrieben, was möglicherweise auf die stark variierte Größe der skalaren Kopplungskonstanten von Phosphor-Stickstoff-Verbindungen zurückzuführen ist.^[16] Selbst für Phosphohistidine sind keine Kopplungskonstanten publiziert. Daher haben wir zunächst die Kopplungskonstanten $^1\text{J}(\text{N}^{15}, \text{P}^{31})$ in Phosphohistidinen gemessen. Auf der Grundlage dieser Werte wurde das erwähnte HNP-Experiment entworfen, das direkt Histidinphosphorylierungen nachweist und aufgrund der charakteristischen, von der chemischen Verschiebung unabhängigen Korrelationsmuster die Regiochemie eindeutig anzeigt.

Magnetisierung kann von ^1H zu ^{31}P in Phosphohistidinen mithilfe skalärer Kopplungen zwischen ^1H und ^{15}N ($^2\text{J}(\text{H}^{1}, \text{N}^{15})$ und $^3\text{J}(\text{H}^{1}, \text{N}^{15})$) sowie zwischen ^{15}N und ^{31}P ($^1\text{J}(\text{N}^{15}, \text{P}^{31})$) für alle Arten phosphorylierter Histidine transferiert werden. Im Spektrum zeigen sich ein, zwei oder drei Kreuzsignale zwischen ^1H und ^{31}P für die Phosphohistidine **1**, **2** bzw. **3** (Abbildung 1). Die einzige Voraussetzung ist, dass die Effizienz des $^1\text{J}(\text{N}^{15}, \text{P}^{31})$ -Transfers möglichst unabhängig von der Art des Phosphorylierungsmusters ist. Um die charakteristischen und für die Regiochemie spezifischen Korrelationsmuster zu erhalten, nutzten wir die großen Unterschiede der skalaren Kopplungen zwischen ^1H und ^{15}N ($^2\text{J}(\text{H}^{1}, \text{N}^{15})$ und $^3\text{J}(\text{H}^{1}, \text{N}^{15})$). Die signifikant kleinere Kopplungskonstante $^3\text{J}(\text{H}^{1}, \text{N}^{15})$ (-2 Hz) verglichen mit $^2\text{J}(\text{H}^{1}, \text{N}^{15})$ in Histidin (-5 bis -10 Hz) bewirkt einen deutlich weniger effizienten Magnetisierungstransfer, sodass die Intensität der $^3\text{J}(\text{H}^{1}, \text{N}^{15})$ -vermittelten Kreuzsignale um einen Faktor 6 bis 20 schwächer ist als die der $^2\text{J}(\text{H}^{1}, \text{N}^{15})$ -vermittelten Kreuzsignale.^[6,17] Dadurch ist es möglich, die Phosphorylierungszustände anhand individueller

[*] S. Himmel, S. Wolff, Dr. S. Becker, Dr. D. Lee, Prof. Dr. C. Griesinger
Abteilung für NMR-basierte Strukturbioologie
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)
Fax: (+49) 551-201-2202
E-Mail: dole@nmr.mpibpc.mpg.de
cigr@nmr.mpibpc.mpg.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Max-Planck-Gesellschaft unterstützt.
Wir danken Dr. S. Hübner und Prof. Dr. J. Stölke, Institut für Mikrobiologie und Genetik der Universität Göttingen, für Bakterienklone mit El-, HPr- und GlcT-Plasmid-DNA. Weiterhin danken wir Dr. M. Sabo und Prof. Dr. J. Stölke für die kritische Lektüre dieses Manuskripts.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201003965> zu finden.

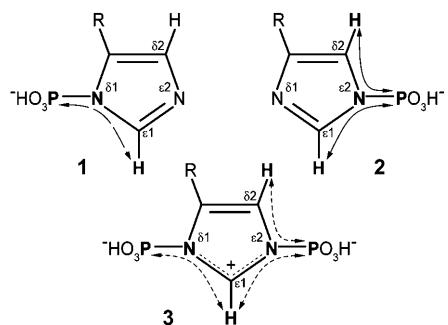


Abbildung 1. Die Phosphorylierungszustände im Imidazolring des Histidins. **1:** $\delta 1$ -Phosphorylierung (1-Phosphohistidin); **2:** $\epsilon 2$ -Phosphorylierung (3-Phosphohistidin); **3:** $\delta 1, \epsilon 2$ -Diphosphorylierung (1,3-Diphosphohistidin). Geschwungene Pfeile deuten den Transfer von ^1H über ^{15}N auf ^{31}P im HNP-Experiment an, um die drei Spezies **1**, **2** und **3** zu identifizieren. ——: eine $^1\text{H}^{\epsilon 1} \cdot ^{15}\text{N}^{\delta 1} \cdot ^{31}\text{P}^{\delta 1}$ -Korrelation; -----: $^1\text{H}^{\epsilon 1} \cdot ^{15}\text{N}^{\delta 1} \cdot ^{31}\text{P}^{\delta 1}$ -Korrelationen; ——: $^1\text{H}^{\epsilon 1} \cdot ^{15}\text{N}^{\epsilon 2} \cdot ^{31}\text{P}^{\epsilon 2}$ - und $^1\text{H}^{\delta 2} \cdot ^{15}\text{N}^{\epsilon 2} \cdot ^{31}\text{P}^{\epsilon 2}$ -Korrelationen; ^1H -, ^{15}N - und ^{31}P -Kerne, die beim Magnetisierungstransfer eine Rolle spielen, sind fett hervorgehoben. Die Magnetisierung wird durch skalare Kopplungen transferiert ($^2J(^1\text{H}, ^{15}\text{N})$ und $^1J(^{15}\text{N}, ^{31}\text{P})$). Die Zahl an Kreuzsignalen im HNP-Spektrum, entsprechend der Zahl an Pfeilen, ermöglicht die Identifizierung des Phosphorylierungsmusters des Imidazolrings.

Korrelationsmuster zu bestimmen (HNP-Experiment). Da die Größe von $^1J(^{15}\text{N}, ^{31}\text{P})$ in Phosphohistidinen bisher nicht bekannt war und sie auch noch durch variable pK_a -Werte in Proteinen beeinflusst werden könnte, bestimmten wir die Kopplungskonstante $^1J(^{15}\text{N}, ^{31}\text{P})$ an freien Phosphohistidinen in einem pH-Bereich, bei dem die Phosphohistidine hinreichend stabil waren: für **1** und **2** von pH 3 bis 10 (Abbildung 2a) und für **3** von pH 6 bis 9 (Abbildung 2b).

Für **1** und **2** beobachteten wir eine deutliche Variation von $^1J(^{15}\text{N}, ^{31}\text{P})$ mit dem pH-Wert zwischen 5 und 17 Hz. Da die

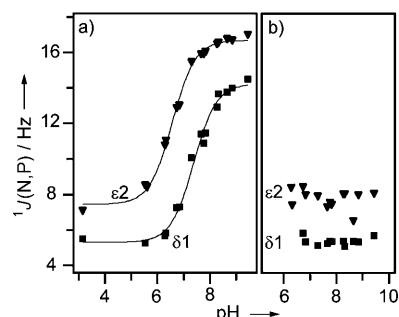


Abbildung 2. pH-Abhängigkeit der skalaren Kopplung: a) **1** (■ $\delta 1$ -Phosphorylierung) und **2** (▼ $\epsilon 2$ -Phosphorylierung); b) **3** (■ $\delta 1$ -Phosphorylierung und ▼ $\epsilon 2$ -Phosphorylierung). Die Kopplungskonstanten $^1J(^{15}\text{N}, ^{31}\text{P})$ wurden in 1D- ^{31}P -NMR-Titrationsexperimenten bestimmt und mithilfe einer sigmoidalen Funktion angepasst, dargestellt als Graph (—). Die Wendepunkte für **1** und **2** liegen bei pH 7.4 bzw. 6.6 und entsprechen der pH-abhängigen Protonierung am nichtphosphorylierten Stickstoffatom des Histidins. Da **3** kein nichtphosphoryliertes Stickstoffatom enthält, konnte keine pH-Abhängigkeit in (b) beobachtet werden. Die Abbildung zeigt deutlich, dass die Kopplungskonstanten von **1** und **2** (a) bei niedrigem pH mit denen von **3** (b) identisch sind. Ursache hierfür ist die Ähnlichkeit in der elektronischen Struktur mit dem vollständig protonierten Imidazolring. Aufgrund schnell einsetzender Hydrolyse konnten keine NMR-Signale für **3** bei pH < 6 beobachtet werden.

Wendepunkte gut mit den pK_a -Werten der jeweiligen nichtphosphorylierten Stickstoffatome des Histidins übereinstimmen,^[12, 18] liegt es nahe, dass die Protonierung dieses Stickstoffatoms die Größe der Kopplungskonstante maßgeblich beeinflusst. In Übereinstimmung mit dieser Annahme zeigt sich bei der doppelt phosphorylierten Form **3** keine pH-Abhängigkeit, da kein protonierbares Stickstoffatom mehr im Imidazolring des Histidins vorhanden ist. Der Verlauf der Titrationskurven zeigt einen Unterschied von lediglich 0.8 pH-Einheiten zwischen den pK_a -Werten, was jedoch zur Folge hat, dass die Kopplungskonstanten bei pH 6.3 um etwa den Faktor 2 unterschiedlich sind. Die deutliche Abhängigkeit von $^1J(^{15}\text{N}, ^{31}\text{P})$ vom Protonierungszustand ist nicht sonderlich überraschend, da ein ähnlicher Effekt bei pH-Titrationen für $^1J(^{13}\text{C}, ^{15}\text{N})$ in nichtphosphoryliertem Histidin bereits beobachtet werden konnte.^[17, 19]

Analog zu den Kopplungskonstanten $^1J(^{15}\text{N}, ^{31}\text{P})$ für **1** und **2** beobachteten wir ein pH-abhängiges sigmoidales Verhalten der chemischen Verschiebungen für ^{15}N (nicht gezeigte Daten). Es ist erwähnenswert, dass die $^1J(^{15}\text{N}, ^{31}\text{P})$ -Werte von **3** praktisch identisch mit denen von protoniertem **1** und **2** sind. Daher liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die Phosphatgruppe und das Proton ähnlich stark elektronenziehend wirken.

Mit den nun bekannten $^1J(^{15}\text{N}, ^{31}\text{P})$ -Werten in Phosphohistidinen entwarfen wir ein HNP-Experiment (Abbildung 3), bei dem Magnetisierung von ^1H -Protonen über ^{15}N hin zu ^{31}P und zurücktransferiert wird. Es beruht auf einem „Weitbereichs“- $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC,^[6] kombiniert mit einem zusätzlichen $^{15}\text{N}, ^{31}\text{P}$ -HSQC. Das $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC wird hierbei gegenüber dem HMBC bevorzugt, da keine homonuklearen Kopplungen zwischen Protonen die Transfereffizienz des

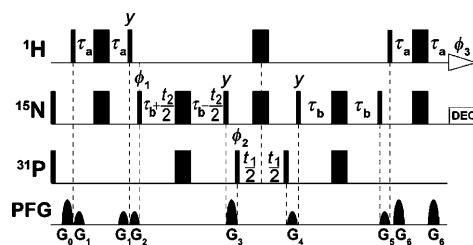


Abbildung 3. NMR-Pulsesequenz des HNP-Experiments zur Identifizierung phosphorylierter Histidine. Schmale Balken entsprechen nichtselektiven 90°-Pulsen, breite Balken nichtselektiven 180°-Pulsen. Pulsphasen sind x , sofern nicht anderweitig angegeben. Wartezeiten ergeben sich wie folgt: $\tau_a = 11$ ms, $\tau_b = 25$ ms = $(4J(^{15}\text{N}, ^{31}\text{P}))^{-1}$. Phasen wurden folgendermaßen variiert: $\phi_1 = \{x, -x\}$, $\phi_2 = \{x, x, -x, -x\}$ und $\phi_3 = \{-x, x, x, -x\}$. ^1H - und ^{31}P -Trägerfrequenzen liegen bei $\delta = 4.7$ ppm bzw. -3 ppm. Die ^{15}N -Trägerfrequenz befindet sich bei $\delta = 210$ ppm für Histidin, $\delta = 200$ ppm für HPr und $\delta = 205$ ppm für PRDI. Die ^{15}N -Entkopplung beruht auf der GARP-Pulssequenz mit einer Feldstärke von 1.3 kHz. PFG („pulsed field gradient“; Feldgradientenpulse) beschreibt die Stärke der magnetischen Feldgradienten in z-Richtung. Dauer: G_0 und G_6 : 1 ms; G_{1-5} : 0.5 ms. Amplitude: G_0 : 45 G cm^{-1} , G_1 : 11 G cm^{-1} , G_2 : 17 G cm^{-1} , G_3 : 36 G cm^{-1} , G_4 : 6 G cm^{-1} , G_5 : 15 G cm^{-1} und G_6 : 30 G cm^{-1} . „States-TPPI“-Quadratur-Detektion mit alternierenden Phasen von ϕ_1 und ϕ_2 wurde zur Frequenzunterscheidung in beiden indirekten Dimensionen verwendet. Alle Experimente wurden an einem Bruker Avance Spektrometer (600 MHz für ^1H) mit QCI-Probenkopf durchgeführt.

HSQC reduzieren können und so die Gesamtzeit der transversalen ^1H -Magnetisierung minimiert wird. Die De- und Refokussierungszeit für $^1\text{J}(\text{N}^{15}, \text{P}^{31})$ ist mit $\tau_b = 25$ ms auf eine durchschnittliche Kopplungskonstante von 10 Hz optimiert (Abbildung 2). Damit wird ein hinreichend effizienter Magnetisierungstransfer für alle Phosphorylierungsmuster erreicht. Um die Leistungsfähigkeit des HNP-Experiments zu testen, untersuchten wir ein Probengemisch aus **1**, **2** und **3**, das unmittelbar durch die chemische Phosphorylierung von Histidin mit Phosphoramidat (PA) gewonnen wurde (Abbildung 4).^[12] In Übereinstimmung mit Abbildung 1 zeigt Verbindung **1** ein einzelnes $^1\text{H}, ^{31}\text{P}$ -Kreuzsignal, Verbindung **2**

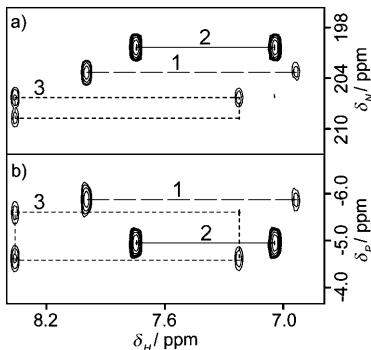


Abbildung 4. 2D-Projektionen eines 3D-HNP-Spektrums phosphorylierter Histidine bei pH 7.5 und 303 K: a) $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -Projektionen; b) $^1\text{H}, ^{31}\text{P}$ -Projektionen. Das Spektrum wurde mit 4 Scans und 17 (^{31}P), 35 (^{15}N) und 512 (^1H) komplexen Datenpunkten innerhalb von etwa 4 h aufgenommen mit einer Gesamtzeit von $t_{1\max} = 8.7$ ms, $t_{2\max} = 7.2$ ms und $t_{3\max} = 65.8$ ms. Die Identifizierung aller drei Phosphorylierungszustände im Imidazolring des Histidins ist entsprechend der Abbildung 1 wie folgt hervorgehoben: Das Einpeakmuster 1 (---) ist charakteristisch für **1**, das Zweipeakmuster 2 (—) für **2** und das Dreipeakmuster 3 (----) für **3**. Die schwachen Kreuzsignale bei 1 und 3 sind das Ergebnis kleiner Kopplungen zwischen $^1\text{H}^{62}$ und $^{15}\text{N}^{81}$ ($^3\text{J}(\text{H}^{15}\text{N})$).

zwei Kreuzsignale mit identischer chemischer Verschiebung für ^{15}N und Verbindung **3** drei $^1\text{H}, ^{31}\text{P}$ -Kreuzsignale, die, aufgrund der beiden beteiligten Stickstoffatome, an drei Ecken eines Rechtecks liegen. Die wenig intensiven Kreuzsignale für **1** und **3** röhren, wie bereits eingangs beschrieben, von den sehr viel kleineren $^3\text{J}(\text{H}^{15}\text{N})$ -Werten für die Kopplung zwischen $^1\text{H}^{62}$ und $^{15}\text{N}^{81}$ her.^[6]

Um die Anwendbarkeit für Proteine zu demonstrieren, wählten wir das Phosphocarrierprotein HPr aus, das als ein zentrales Enzym des Phosphotransferasesystems (PTS) in Prokaryoten die Aufnahme verschiedener Kohlenhydrate reguliert.^[20] Die Phosphorylierung an Histidin 15 ist bereits ausführlich beschrieben worden^[21, 22] und kann sehr effizient mit enzymatischer Phosphorylierung erreicht werden (siehe die Hintergrundinformationen). Für HPr finden wir ein für **1** charakteristisches Einpeakmuster (Abbildung 5a und S1), das auf eine N^{81} -Phosphorylierung hinweist.^[21, 22] Die Größe von $^1\text{J}(\text{N}^{15}, \text{P}^{31})$ in Phospho-HPr (9.5 Hz bei pH 7.4) stimmt sehr gut mit dem aus der pH-Titration von **1** gewonnenen Wert für die Kopplungskonstante überein.

Um die Anwendbarkeit unserer Methode an einem weiteren anspruchsvollen Beispiel zu testen, nahmen wir ein 3D-

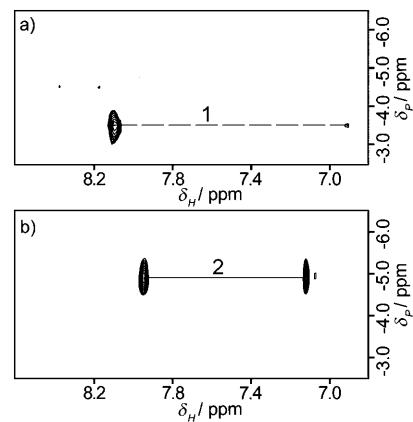


Abbildung 5. 2D- $^1\text{H}, ^{31}\text{P}$ -Projektionen der HNPs für a) das Phosphocarrierprotein (HPr) von *Bacillus subtilis* und b) die Phosphotransferase-system-Regulierungsdomäne I (PRDI) des Antiterminatorproteins GlcT, mit Phosphorylierung gemäß **1** für HPr und gemäß **2** für die PRDI.

HNP-Spektrum der Phosphotransferasesystem-Regulierungsdomäne I (PRDI) des Antiterminatorproteins GlcT von *Bacillus subtilis* auf. Von dieser Domäne ist lediglich bekannt, dass eines von sieben Histidinen phosphoryliert wird, jedoch ist nicht bekannt, welches der Histidine phosphoryliert wird und was die Regiochemie ist.^[23] Wie in Abbildung 5b gezeigt, ist die PRDI an der N^{82} -Position (Muster 2, siehe Abbildung 4) eines der sieben Histidine phosphoryliert und weicht damit deutlich vom Phosphorylierungsmuster 1 in HPr ab.

Grundsätzlich kann τ_b so verändert werden, dass alle Phosphorylierungszustände eines Histidins, basierend auf den individuellen Kopplungskonstanten $^1\text{J}(\text{P}^{31}, \text{N}^{15})$ freier Phosphohistidine und den pK_a -Werten der Phosphohistidine in einem Protein, bestimmt werden können. Wie bereits erwähnt, können die pK_a -Werte aufgrund von räumlich benachbarten Resten im Protein variieren. Da allerdings alle Phosphorylierungsstellen in freien Phosphohistidinen anhand spezifischer H,P-Korrelationsmuster problemlos bestimmt werden konnten, ist die Verwendung von $\tau_b = 25$ ms ein guter Ausgangspunkt. Die Experimente dauerten 20 und 67 Stunden für HPr bzw. PRDI. Die Empfindlichkeit kann um den Faktor $\sqrt{2}$ gesteigert werden, wenn man die H, N - oder H, P -Korrelation als 2D-Experiment durchführt. Allerdings könnten in einem 2D-Experiment bei mehr als einer Phosphorylierungsstelle Zweideutigkeiten auftreten, sollte in dem engen chemischen Verschiebungsbereich (ca. 200 bis 210 ppm für ^{15}N und ca. 0 bis -10 ppm für ^{31}P) mehr als ein phosphoryliertes Histidin vorliegen. Diese Signalüberlagerungen können mit dem 3D-Experiment vermieden werden. Für größere Proteine mit kürzeren Protonen- und ^{15}N - T_2 -Zeiten können die τ_a - und τ_b -Zeiten weiter optimiert werden.

Zusammenfassend haben wir in dieser Arbeit die pH-Abhängigkeit von $^1\text{J}(\text{H}, \text{N}^{15})$ in Phosphohistidinen untersucht. Aufbauend auf diesen Kopplungskonstanten haben wir hier ein HNP-Experiment vorgestellt, das die Regiochemie von Histidinphosphorylierungen aufklärt. Das Experiment funktionierte hervorragend an zwei Beispielproteinen (HPr und PRDI) und lieferte unterschiedliche Phosphorylierungsmuster, was so nicht voraussehbar war. Bisherige Methoden

zur Bestimmung der Regiochemie erforderten zeitaufwendige pH-Titrationen, Hydrolysestudien und/oder Vergleichsstudien mit phosphorylierten Referenzverbindungen. Wir sind zuversichtlich, dass das hier vorgestellte HNP-Experiment die Untersuchung der für prokaryotische und, wie neuerdings gefunden, auch eukaryotische Zellen wichtigen Histidinphosphorylierung erleichtern wird.^[24–26]

Eingegangen am 30. Juni 2010

Online veröffentlicht am 11. Oktober 2010

Stichwörter: Histidinphosphorylierung · NMR-Spektroskopie · pH-abhängige skalare Kopplung · Regiochemie · Signaltransduktion

-
- [1] P. V. Attwood, M. J. Piggott, X. L. Zu, P. G. Besant, *Amino Acids* **2007**, *32*, 145–156.
 - [2] J. Puttick, E. N. Baker, L. T. J. Delbaere, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2008**, *1784*, 100–105.
 - [3] P. G. Besant, P. V. Attwood, *Mol. Cell. Biochem.* **2009**, *329*, 93–106.
 - [4] A. R. S. Ross, *Methods Enzymol.* **2007**, *423*, 549–572.
 - [5] X. L. Zu, P. G. Besant, A. Imhof, P. V. Attwood, *Amino Acids* **2007**, *32*, 347–357.
 - [6] J. G. Pelton, D. A. Torchia, N. D. Meadow, S. Roseman, *Protein Sci.* **1993**, *2*, 543–558.
 - [7] M. Brauer, B. D. Sykes, *Methods Enzymol.* **1984**, *107*, 36–81.
 - [8] T. L. James, *Crit. Rev. Biochem.* **1985**, *18*, 1–30.
 - [9] P. Rajagopal, E. B. Waygood, R. E. Klevit, *Biochemistry* **1994**, *33*, 15271–15282.
 - [10] H. J. Vogel, W. A. Bridger, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 4834–4842.
 - [11] A. Lecroisey, I. Lascu, A. Bominaar, M. Veron, M. Delepierre, *Biochemistry* **1995**, *34*, 12445–12450.
 - [12] D. E. Hultquist, R. W. Moyer, P. D. Boyer, *Biochemistry* **1966**, *5*, 322–331.
 - [13] D. E. Hultquist, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1968**, *153*, 329–340.
 - [14] E. B. Waygood, E. Erickson, O. A. L. Elkabbani, L. T. J. Delbaere, *Biochemistry* **1985**, *24*, 6938–6945.
 - [15] T. Carlomagno, M. Maurer, M. Sattler, M. G. Schwendinger, S. J. Glaser, C. Griesinger, *J. Biomol. NMR* **1996**, *8*, 161–170.
 - [16] S. Berger, S. Braun, H.-O. Kalinowski, *NMR Spectroscopy of the Non-Metallic Elements*, Wiley-Chichester, **1997**.
 - [17] F. Blomberg, W. Maurer, H. Ruterjans, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 8149–8159.
 - [18] M. Gassner, D. Stehlik, O. Schrecker, W. Hengstenberg, W. Maurer, H. Ruterjans, *Eur. J. Biochem.* **1977**, *75*, 287–296.
 - [19] H. Schmidt, S. Himmel, K. F. A. Walter, V. Klaukien, M. Funk, D. Lee, *J. Korean Magn. Reson.* **2008**, *12*, 89–95.
 - [20] N. D. Meadow, D. K. Fox, S. Roseman, *Annu. Rev. Biochem.* **1990**, *59*, 497–542.
 - [21] B. Anderson, N. Weigel, W. Kundig, S. Roseman, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 7023–7033.
 - [22] O. Schrecker, R. Stein, W. Hengstenberg, M. Gassner, D. Stehlik, *FEBS Lett.* **1975**, *51*, 309–312.
 - [23] M. H. Schmalisch, S. Bachem, J. Stulke, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 51108–51115.
 - [24] S. Klumpp, J. Kriegstein, *Sci. Signaling* **2009**, *2*, pe13.
 - [25] S. Srivastava, Z. Li, K. Ko, P. Choudhury, M. Albaqumi, A. K. Johnson, Y. Yan, J. M. Backer, D. Unutmaz, W. A. Coetze, E. Y. Skolnik, *Mol. Cell* **2006**, *24*, 665–675.
 - [26] P. S. Steeg, D. Palmieri, T. Ouatas, M. Salerno, *Cancer Lett.* **2003**, *190*, 1–12.