

Moderne biomolekulare Massenspektrometrie und ihre Bedeutung für die Erforschung der Struktur, der Dynamik und des Aufbaus von Viren

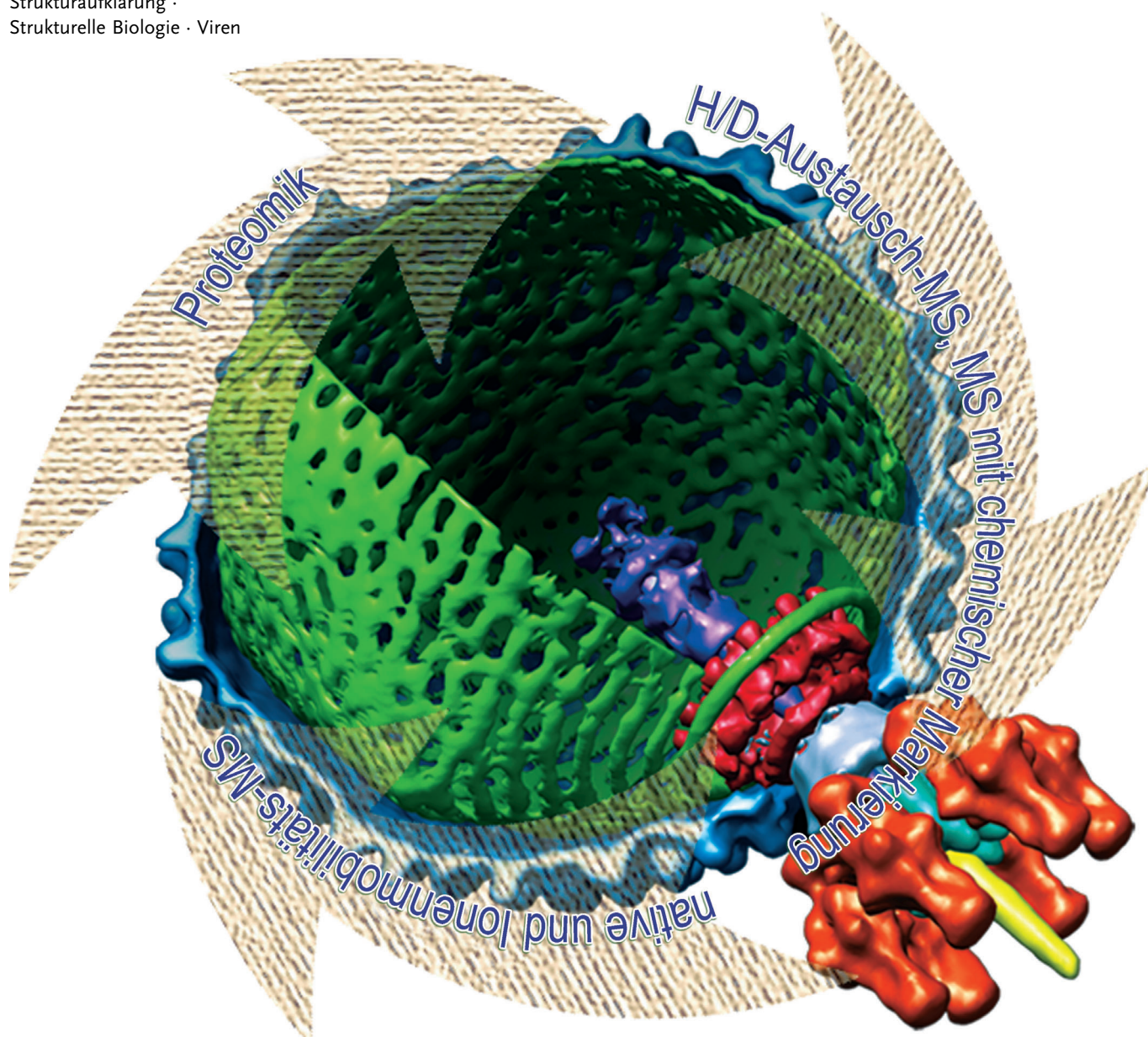
Charlotte Uetrecht und Albert J. R. Heck*

Stichwörter:

Massenspektrometrie · Proteomik ·

Strukturaufklärung ·

Strukturelle Biologie · Viren



Angewandte
Chemie

Entwickelt vor über einem Jahrhundert und beliebter denn je, findet die Massenspektrometrie als analytisches Verfahren heute in beinahe allen Bereichen der Naturwissenschaften Anwendung. Entwicklungen in den letzten beiden Jahrzehnten ermöglichten die Erforschung von Proteinen, sogar intakten Proteinkomplexen, und eine ernsthafte Nutzung in der Strukturbiologie. In diesem Aufsatz beschreiben wir die wachsende Bedeutung der Massenspektrometrie und ihrer technischen Spielarten für die Strukturbiologie anhand einer ausführlichen Betrachtung der strukturellen Virologie. Wir gehen auf die Entwicklung der Massenspektrometrie zu einem Werkzeug ein, das einzigartige Informationen über Struktur, Konformation, Topologie, Aufbau und Funktion von viralen Protein(komplex)en liefern kann, was schließlich in der direkten Analyse von intakten Viruskapsiden mit einer Masse von mehreren Millionen Dalton gipfelt. Die Massenspektrometrie wird heute zur Bearbeitung weitreichender Fragen der Virologie genutzt und hilft so z. B. zu klären, wie Viren aufgebaut werden und wie sie mit ihrem spezifischen Wirt interagieren.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	8399
2. Allgemeine Konzepte der Strukturvirologie	8400
3. Massenspektrometrie in der strukturellen Virologie	8403
4. Ausblick	8410

1. Einleitung

Massenspektrometrie (MS) ist heute eine weitverbreitete analytische Technik und wird von den meisten Forschern in den Naturwissenschaften angewendet. Die technischen Grundlagen für die MS wurden vor etwa 100 Jahren gelegt, als Thomson und Aston unter den Ersten waren, die Partikel unterschiedlicher Masse/Ladungs-Verhältnisse (m/z) auf trennten und so Isotope von Edelgasen und anderen Elementen entdeckten. Ein halbes Jahrhundert lang blieb die MS primär den Physikern vorbehalten, mit teilweise zweifelhaften Anwendungen, da sie auch zur Anreicherung von Uran für das Manhattan-Projekt genutzt wurde.^[1] Um die 1960er wurde die Technik vermehrt von Chemikern eingesetzt, z. B. in der Ölindustrie, um die chemische Natur von Komponenten zu untersuchen, die in Aufbereitungsprozessen entstanden. Im Bereich der Chemie erlangte die MS schließlich besonders bei der chemischen Analyse von unbekannten Stoffen Bedeutung (unterstützt durch die Kopplung mit Trenntechniken wie Gas- und Flüssigchromatographie). Sie etablierte sich auch als eigenständiges Forschungsfeld, organische MS genannt, das sich dem Studium von Struktur und Fragmentationsmechanismen der Ionen sowie Ionen-Molekül-Reaktionen widmete.^[2]

Bis in die 1980er gelang es nicht, größere Moleküle als intakte gasförmige Ionen in das Vakuum des Massenspektrometers zu überführen. Dieses entscheidende Nadelöhr für die Analyse wurde schrittweise durch neue Desorptionstechniken überwunden und resultierte in der Einführung von Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation (MALDI)^[3] und Elektrospray-Ionisation (ESI)-MS.^[4] Diese neuen Ionisationsmethoden, zusammen mit bahnbrechenden Innovationen in der Instrumentierung, eröffneten Anwendungen vor allem in der Biologie, Nanotechnologie, Polymerwissenschaft und Medizin, aber auch auf vielen anderen Gebieten der Naturwissenschaften.

In den Lebens-/Biowissenschaften wurde die MS zur Schlüsseltechnik für die Peptidsequenzierung,^[5] mit der die Identität von Proteinen ermittelt werden kann. Die Geschwindigkeit und Empfindlichkeit der MS ermöglichen die qualitative und quantitative Analyse des Proteingehalts ganzer Zellen oder Gewebe, heute als Proteomik bezeichnet.^[6] Ähnlich kann mit MS die chemische Analyse zur Kartierung von Gehalten kleiner Moleküle in einer Zelle oder Körperflüssigkeit durchgeführt werden, dementsprechend Metabolomik genannt.^[7] Neue Desorptionstechniken und spezielle, zweckgebundene Massenspektrometer, gekoppelt mit bildgebenden Methoden, ermöglichen sogar die MS-basierte Abbildung von Stoffverteilungen (von Proteinen, Neuropeptiden, Stoffwechselprodukten, Wirkstoffen) in einem Gewebe oder Organell mithilfe positionsgenauer Messungen.^[8] Weiterhin wurden Desorptionsverfahren unter Umgebungsdruck eingeführt, um Oberflächen und Organismen direkt auf Moleküle hin abzutasten.^[9]

Die Wichtigkeit von MALDI und ESI für die revolutionären Entwicklungen wurde durch die Vergabe des Nobelpreises in Chemie an den kürzlich verstorbenen John B. Fenn und an Koichi Tanaka gewürdigt. Erster betitelte seine Nobelpredlesung „Electrospray Wings for Molecular Elephants“ (Elektrosprayflügel für molekulare Elefanten),^[10] da ESI (und MALDI) das verfügbare Massenregime für die MS

[*] Dr. C. Uetrecht,^[+] Prof. Dr. A. J. R. Heck
Biomolecular Mass Spectrometry and Proteomics Group,
Bijvoet Center for Biomolecular Research and Utrecht Institute for
Pharmaceutical Sciences, University of Utrecht
Padualaan 8, 3584 CH Utrecht (Niederlande)
und
Netherlands Proteomics Centre (Niederlande)
E-Mail: a.j.r.heck@uu.nl

[†] aktuelle Adresse: Laboratory of Molecular Biophysics, Uppsala-
University
Uppsala (Schweden)

mindestens um den Faktor 1000 erweiterten. Kurz nach der Einführung von ESI wurde klar, dass nicht nur die Masse von vollständigen Proteinen, sondern auch ihre Tertiär- und Quartärstruktur teilweise erhalten und daher analysiert werden konnten. Dies wurde z.B. durch die frühe Entdeckung belegt, dass der nichtkovalente Komplex zwischen Myoglobin und seinem Hämkofaktor in der Gasphase intakt bleiben kann.^[11] Bahnbrechende Arbeiten von Standing et al.,^[12,13] Smith, Loo et al.,^[14,15] Robinson et al.^[16–19] und unserer eigenen Gruppe^[20,21] im Bereich der MS von komplexen makromolekularen Komplexen führten zu einem neuen, wichtigen Hilfsmittel für die Strukturbiologie, nun „native Massenspektrometrie“ genannt.^[22]

Außer dem gut etablierten Peptidsequenzierungsansatz und nativer MS gibt es noch viele weitere facettenreiche, moderne Anwendungen, die für die Analyse von Proteinen aus verschiedensten Blickwinkeln relevant sind. Besonders H/D(Wasserstoff/Deuterium)-Austausch und chemische Markierung von lösungsmittelzugänglichen Aminosäuren in Kombination mit MS oder Chemische-Vernetzungs-MS können unser Wissen über die Beziehung zwischen Proteinstruktur und -funktion erweitern. In diesem Aufsatz beschreiben wir, wie solche massenspektrometrischen Methoden eingesetzt werden können, um unterschiedliche Aspekte von Proteinstruktur und -funktion zu studieren. Dabei richten wir das Hauptaugenmerk auf die biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften von Viren und viralen Teilchen.

Viren sind ideale Modellsysteme, um den Aufbau von Proteinkomplexen zu untersuchen, da die viralen Proteinhüllen – die Kapside – sogar in vitro ohne die Unterstützung von Faltungshelfern (Chaperonen) häufig die beeindruckende Fähigkeit zur Selbstorganisation ihrer Faltung sowie ihres Zusammenbaus aufweisen.^[23] Außerdem zeichnet ihre naturgemäße Eigenschaft, Material (das virale Genom) einzukapseln, die Viruskapside als interessante Zielobjekte für nanotechnologische Anwendungen aus, die weit über Medikamentenverabreichung hinausreichen.^[24] Die detaillierte biophysikalische und biochemische Charakterisierung des Prozesses von Virusaufbau und -reifung ist entscheidend, da solche Daten dazu genutzt werden könnten, einer viralen Infektion entgegenzuwirken.^[25] Technisch gesehen ist das Studium des Virusaufbaus anspruchsvoll, da die gebildeten Aggregate mitunter sehr groß sind. Dies behindert die klassische Strukturuntersuchung mit Methoden wie Röntgen-

kristallographie und NMR-Spektroskopie. Ein weiteres Problem bereitet die Kurzlebigkeit der Intermediate des Aufbau- und/oder Reifungsprozesses, die die Aufreinigung und Analyse erschwert.^[26] Ungeachtet der Tatsache, dass Virusstruktur, -dynamik und -aufbau seit Jahrzehnten studiert werden, hat die MS in diesen Forschungszweig in den vergangenen Jahren Einzug gehalten; mit ihr wurden diverse bedeutende Fragen angegangen, die auf andere Weise nur schwer zu beantworten waren.^[27] Proteomikansätze wurden frühzeitig genutzt, um das „neue“ SARS-Virus zu untersuchen,^[28] aber MS ist auch eine aufstrebende Methode, um die Bausteine eines Virus, die Stöchiometrie der viralen Strukturproteine, den Virusaufbau und die entsprechenden Intermediate zu entschlüsseln.^[27] Nach kurzer Erläuterung einiger zentraler Konzepte der Strukturvirologie beschreiben wir, wie die moderne MS die Charakterisierung von Viren, insbesondere unter Berücksichtigung von Strukturaspekten, vorantreiben kann.

2. Allgemeine Konzepte der Strukturvirologie

Viren sind ansteckende Erreger, die sich nur in einem Wirt vermehren können.^[29] Wegen ihrer geringen Größe (nm bis μm) sind die meisten Viren im Lichtmikroskop nicht sichtbar.^[30–32] Viren sind allgegenwärtig; sie finden sich in Archaeen, Bakterien, Pflanzen und Tieren.^[33–38] Schätzungen zufolge tragen Viren nach den Prokaryoten die zweitgrößte Menge zur Biomasse auf der Erde bei.^[39] Die häufigsten Viren sind solche mit bakteriellen Wirten, so genannte Phagen. Das virale Genom kodiert für alle viralen Proteine, die für die Replikation im geeigneten Wirt notwendig sind, zwischen einigen hundert und wenigen verschiedenen Proteinen. Wegen der fehlenden Fähigkeit, sich eigenständig zu vermehren, werden Viren oft nicht als Lebensform angesehen.^[40] Allerdings dauert diese Debatte noch an und wurde kürzlich durch die Entdeckung des Riesennimivirus erneut angefasst.^[30,41] Ferner ist die evolutionäre Abstammung der Viren noch immer unklar: Entwickelten sie sich aus in Zellen replizierenden Nukleinsäurestücken oder durch die Vereinfachung von zellulären Organismen?^[42,43]

Die spezieübergreifende Allgegenwart der Viren lässt bereits eine breite Diversität vermuten, die die Klassifizierung erschwert. Generell werden sie anhand ihrer Wirtorga-



Charlotte Uetrecht, geboren 1982, studierte Biochemie an der Universität Potsdam. Von 2006 bis 2010 war sie unter Betreuung von Albert Heck als Doktorandin an der Universität Utrecht tätig. Ihre dortige Forschung war auf die massenspektrometrische Analyse von viralen Anordnungen ausgerichtet. Seit 2011 ist sie als EMBO-Langzeitstipendiatin im Labor für Molekulare Biophysik der Universität Uppsala (Schweden) tätig, um virale und andere große Strukturen/Teilchen mit MS und Röntgen-Freie-Elektronen-Lasern im Vakuum zu untersuchen.



Albert J. R. Heck, geboren 1964, hat seit 1998 den Lehrstuhl für Biomolekulare Massenspektrometrie & Proteomik an der Universität Utrecht inne. Seit 2003 ist er Direktor des Netherlands Proteomics Centre und seit 2006 auch Direktor des Bijvoet Centers for Biomolecular Research. Seine Forschungsinteressen umfassen alle Aspekte der Proteinmassenspektrometrie. Er erhielt unter anderem die Goldmedaille der Königlich Niederländischen Chemischen Gesellschaft, den Descartes-Huygens-Preis der Republik Frankreich und den Lebenswissenschaftspreis der Deutschen Massenspektrometrischen Gesellschaft.

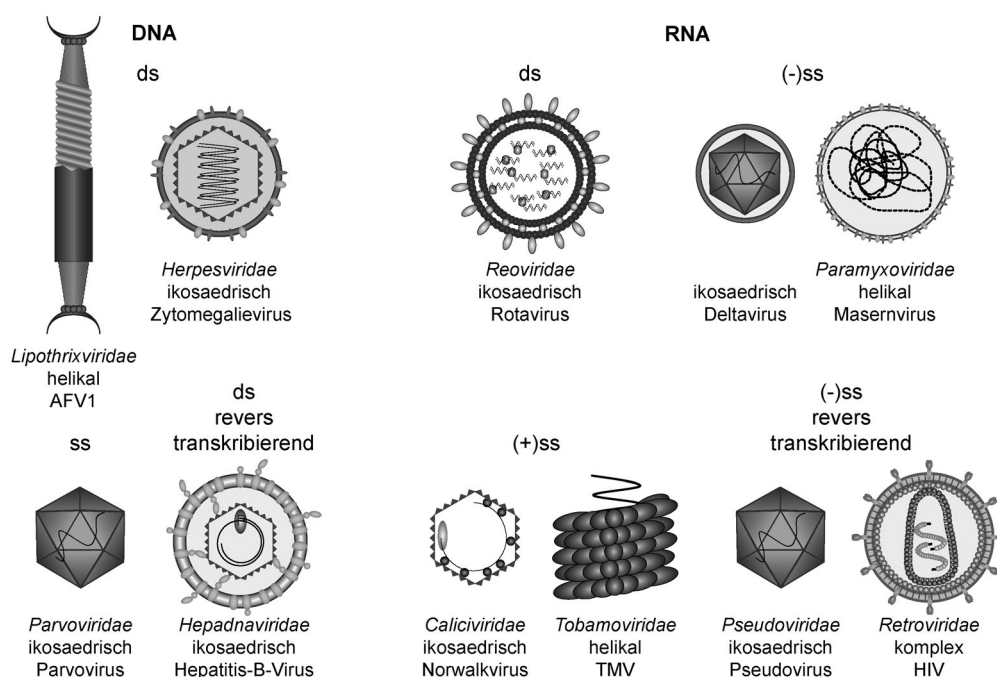


Abbildung 1. Die Virusklassifizierung basiert hauptsächlich auf der Art und Organisation der Nukleinsäure. Eine Auswahl an Virusfamilien und ihrer entsprechenden Morphologien ist abgebildet.

nismen oder morphogenetischen Merkmale und Genomorganisation unterschieden.^[44–47] Das Genom kann durch RNA, aber auch DNA in einzel- oder doppelsträngiger (ss- und ds-) Form kodiert sein, wie in Abbildung 1 beispielhaft dargestellt. Die Erbinformation ist entweder auf dem (+)- oder dem (–)-Strang lokalisiert und erfordert zur Replikation in manchen Fällen eine reverse Transkription. Viren können einzelne oder mehrere Stücke Nukleinsäure in linearer oder zirkulärer Form enthalten. Die tatsächlichen evolutionären Zusammenhänge zwischen Viren sind oft schwer durch einzelne Eigenschaften zu erfassen, was die Taxonomie erschwert. Das Virusgenom ist üblicherweise in einer Proteinhülle, als Nukleokapsid bezeichnet, eingeschlossen. Dieses Kapsid kann eine helikale, ikosaedrische oder komplexe Struktur haben. Bereits das Nukleokapsid kann die Anheftung an und den Eintritt in die Wirtszelle vermitteln. Jedoch sind insbesondere eukaryotische Viren häufig von einer Lipiddoppelschicht umhüllt, die die Bindeproteine enthält.^[48]

2.1. Infektion und Lebenszyklus

Für ihre Vermehrung müssen Viren zunächst ihren Wirt erkennen und ihr Genom in die Zelle einführen. Danach wird die Protein- und Nukleinsäuremaschinerie der Zelle übernommen, um die viralen Bestandteile zu produzieren, worauf schließlich der Zusammenbau und die Freisetzung des infektiösen Virus folgen. Nach der erfolgreichen Anheftung an die Wirtszelle kann das Nukleokapsid über verschiedene Mechanismen in das Zytosol gelangen (Abbildung 2), etwa über die oft bei eukaryotischen Viren angewendete Membranfusion oder Phagozytose.^[37,49,50] Bakteriophagen injizieren ihr Genom im Allgemeinen direkt in die Zelle,^[51,52] wogegen die

meisten anderen Viren das Genom an den Poren des Zellkerns aus dem Kapsid entlassen.^[53] Eine Ausnahme bilden (+)ssRNA-Viren, die ebenfalls ihr Genom im Zytoplasma entblößen, es jedoch außerhalb des Kerns in Membrannähe vervielfältigen.^[54] Manche Viren werden metastabil ins Wirtsgenom aufgenommen, wie Retroviren und lyso-gene Phagen. Die Replikation solcher Proviren wird dann spontan oder durch einen spezifischen Auslöser angeregt.^[55–57] Als Folge der Ansteckung übernimmt das Virus gemeinhin die Kontrolle der zellulären Maschinerie des Wirts, um seine eigene Vermehrung zu ermöglichen.^[58] In späteren Stadi-

en der Infektion ordnen sich die Strukturproteine entweder um neue Kopien der Nukleinsäure oder unabhängig davon an und verpacken die Nukleinsäure anschließend.^[59–61] Schlussendlich werden reife Viren durch Knospung wie bei Vesikeln oder Zerbersten der Zelle als Resultat der viralen Ladung freigesetzt.^[62,63] Das Virus kann sich dann ausbreiten und neue Zellen infizieren, und der Kreislauf beginnt aufs Neue. Auch treten verschiedenste Wege der Replikation während des Lebenszyklus der unterschiedlichen Viren auf. Ein bedeutender Schritt ist normalerweise die Reifung, die den vollständigen Aufbau freisetzungstauglicher, infektiöser Teilchen anzeigt. Dieser Vorgang umfasst eine Vielzahl von biochemischen Anpassungen, darunter durch die eingeschlossene Nukleinsäure ausgelöste Konformationsänderungen, Anlagerung von zusätzlichen Proteinen und/oder posttranslationale Modifikationen von Proteinen wie Phosphorylierung, Glycosylierung, Proteolyse und Vernetzung.^[64–68] Da resistente Zellen einen evolutionären Vorteil durch gesteigerte Lebensfähigkeit haben, sind Viren ein starker Selektionsdruck für den Wirt. Im Umkehrschluss entwickeln sich Viren ständig durch Verändern ihres Genoms. Besonders RNA-Viren weisen häufig eine hohe Mutationsrate auf und forcieren den andauernden Überlebenskampf.^[69] Ein anderer Mechanismus, der zu einer erhöhten Virulenz und einem Wechsel der Wirt-/Artspezifität führt, ist die Rekombination von Genomteilen verwandter Virusstämme, wie in Influenzaviren üblich.^[70,71]

2.2. Kapsidfertigung und -struktur

Das Nukleokapsid ist von entscheidender Bedeutung im viralen Lebenszyklus, da es das virale Genom umschließt und

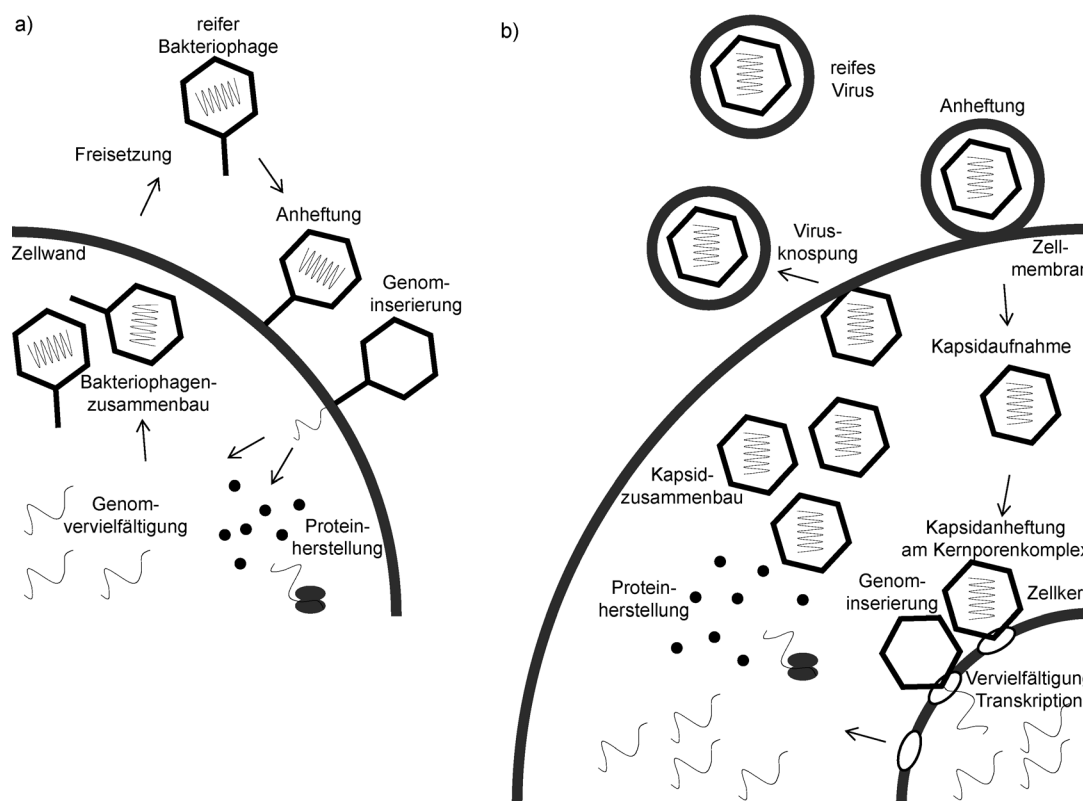


Abbildung 2. Viraler Lebenszyklus: a) Prokaryotische Viren (Phagen) binden an die Wirtszelle und injizieren direkt ihr Genom, wie hier für einen Phagen mit Schwanzfortsatz dargestellt. Im Zytosol werden dann das Genom vervielfältigt und die Proteine exprimiert. Im Falle von schwanztragenden Phagen bildet sich ein leeres Kapsid, in das anschließend das Genom eingelagert wird, woraufhin die Reifung erfolgt. Die zusammengebauten Phagen sammeln sich im Zytoplasma an, bis die Zelle zerbricht. b) Eukaryotische Viren übermitteln ihr Kapsid ins Zytoplasma. Die Aufnahme kann im Fall von umhüllten Viren über Membranfusion erfolgen. Am Kern zerfällt das Kapsid und lässt das Genom frei, das im Kern reproduziert wird. Proteinsynthese und -zusammenbau finden im Zytoplasma statt. Bei (+)ssRNA-Viren wird auch das Genom im Zytoplasma vermehrt. Nach dem Aufbau und einer möglichen Reifung wird das Virus aus der Zelle durch Knospung oder Zellzerstörung entlassen.

schützt. Vornehmlich wegen ihrer Festigkeit und ihrer hohen Effizienz bei der Selbstfertigung und dem Verpacken der Nukleinsäure zeichnen sich Nukleokapside als verblüffende Strukturen aus. Typischerweise bilden viele Kopien eines oder weniger verschiedener Strukturproteine die Kapsidhülle,^[72,73] wobei die Ausgestaltung mit anderen Proteinen bei nicht umhüllten Viren gängig ist.^[74] Diese aufgesetzten Proteine können die Kapsidstabilität erhöhen oder einen Zweck während der Infektion und des Verpackens des Erbguts erfüllen. Die hohe Kopienzahl eines begrenzten Sortiments kleiner Proteine verringert die zur Proteinkodierung benötigte Länge der Nukleinsäure vorteilhaft, da so weniger Platz beim Verkapseln benötigt wird.^[72] Dies verdeutlicht einige der Virusstruktur und -funktion zugrunde liegenden, effizienten Prinzipien.

Viele Kapsidproteine (cp) können leicht in großen Mengen rekombinant hergestellt werden und repräsentieren daher ideale Modellsysteme für das Studium des Protein-(selbst)aufbaus.^[23] Obgleich sich die Bausteine des Kapsidaufbaus von Virus zu Virus unterscheiden, erfolgt der Aufbau gemeinhin in Einklang mit der Keimbildungstheorie. Diese wurde auch für den Amyloidzusammenbau vorgeschlagen.^[73,75,76] Als erstes muss sich ein Aufbaunukleus bilden, der ein oligomeres Aggregat oder lediglich ein konformativ verändertes Monomer sein kann. Danach lagern sich weitere

Bausteine an den Aufbaukeim an, bis das Kapsid vollständig ist (Abbildung 3). Unter ertragreichen Bedingungen ist die Nukleation generell der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, und nur ein kleiner Teil der Proteine bevölkert diesen Übergangszustand. Die anschließenden Elongationsschritte finden in erheblich schnellerer Abfolge statt und führen zur umgehenden Umsetzung des Nukleus zum Kapsid. Deshalb kommen die intermediären oligomeren Spezies, die unter anderem den Keim bilden, unter Aufbaubedingungen normalerweise nur in Spuren vor.^[26,73,76,77] In einigen Fällen lassen sich die Umgebungsbedingungen so ändern, dass eine Übernukleation bevorzugt wird, wobei die Intermediate dann kinetisch gefangen sind. Selbst unter diesen Voraussetzungen können Prozesse wie Proteinfehlfaltung und -aggregation den Nachweis der Übergangszustände weiter behindern.^[67,78–80] Eine niedrige Keimbildungsrate sichert einen erfolgreichen Kapsidaufbau. Die Nukleation kann durch steigende Konzentration oder posttranslationale Modifikation der cp ausgelöst werden, um einen hinreichend hohen Titer in der Zelle zu gewährleisten. Auch die Wechselwirkung mit der Nukleinsäure kann die Bildung des Nukleus fördern.^[78,81,82]

Die entstehenden Viruskapside sind häufig hochstabil gegen Umgebungsänderungen, beispielsweise extreme pH-Werte, hohe Konzentrationen an Denaturierungsmitteln und organische Lösungsmittel, widerstehen dem Verdünnen auf

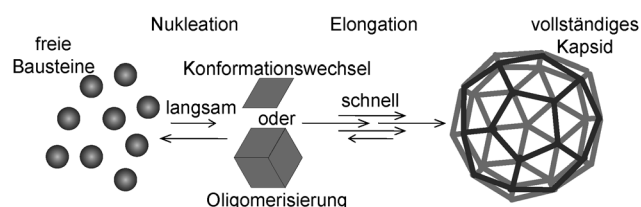


Abbildung 3. Modell des nukleierten Aufbaus: Konformationsänderungen oder Oligomerisierung können zur Nukleation führen. Die Keimbildung ist eine langsame Reaktion, wogegen die anschließende Anlagerung von Bausteinen rasch Richtung Kapsidvollendung fortschreitet. Ist die Nukleation ein schneller Prozess, sammeln sich Aufbauintermediate aufgrund von Übernukleation an, und wenige Kapside werden gebildet.^[73]

sehr niedrige Konzentrationen, die den Aufbau nicht unterstützen, und selbst Austrocknung.^[83–87] Dieser Effekt spiegelt sich in einer bei Dissoziationsexperimenten an Viren zu beobachtenden, starken Hysterese wider. Theoretische und experimentelle Ergebnisse lassen auf eine relativ schwache Wechselwirkung zwischen einzelnen Bausteinen schließen, die diese scheinbar hohe Stabilität nicht bedingen können.^[73,88] Allerdings summieren sich im Kapsid die Bindungsenergien der einzelnen Untereinheiten. Dies erklärt die Pseudostabilität der Kapside unter Bedingungen, bei denen sonst kein Zusammenbau auftritt. Nichtsdestoweniger besagt die Theorie, dass in solch einem Pseudogleichgewicht stets einige freie Bausteine in Lösung sein sollten, die mit den Proteinen im Kapsid dynamisch ausgetauscht werden könnten. Dieser Vorgang wurde als „Kapsidatmung“ (capsid breathing) bezeichnet, und einige indirekte experimentelle Belege, die dieses Modell bestätigen, wurden beschrieben.^[88–92] Der Begriff „Atmung“ wurde im Übrigen auch zur Beschreibung der signifikanten Konformationsänderungen verwendet, die in viralen cp-Proteinen auftreten können und manchmal sogar zu vorübergehender Externalisierung von Domänen führen können, die Strukturmodellen zufolge im Inneren zu finden sein sollten.^[91]

Meistens werden entweder helikale oder ikosaedrische Kapsidstrukturen beobachtet, die beide wegen der hohen Symmetrie die Bildung einer regelmäßigen Hülle aus vielen Kopien eines einzigen cp ermöglichen.^[72] Der Prototyp eines helikalen Virus ist das Tabakmosaikvirus (TMV). Bei diesem bauen sich die cp-Monomere um die RNA herum auf, und die Länge des Genoms bestimmt die Größe des Nukleokapsids.^[93,94] Ikosaedrische Strukturen hingegen ermöglichen die vollständige Abdichtung einer Kapsel unter Verwendung lediglich einer Proteinvariante.^[72] Zusätzlich reduziert die beinahe kugelförmige Struktur die Oberfläche relativ zum eingeschlossenen Volumen. Ein Ikosaeder besteht aus 12 Knoten, 20 Seiten und 30 Kanten entsprechend den verschiedenen Symmetrieachsen (5-, 3-, 2-fach). Mindestens 30, meist dimere Bausteine sind notwendig, um den kleinstmöglichen Ikosaeder zu bilden, bei dem alle Proteine in Pentameren angeordnet sind. Größere Kapside entstehen durch das Zufügen von Hexameren. Ausschließlich festgesetzte Mengen an Hexameren lassen sich einfügen, um einen perfekten Ikosaeder zu erhalten. Die Triangulationsnummer (T) spiegelt dies wider: $T = h^2 + hk + k^2$, wobei h und k positive

ganze Zahlen sind und $T=2$ daher verboten ist. Die Zahl an Bausteinen entspricht $30T$. Obwohl Viruskapside von einem einzigen cp aufgebaut werden können, unterscheiden sich die umgebenden Kontakte in Hexameren und Pentameren.^[95,96] Die zur Kompensation nötigen Konformationsänderungen sind oft marginal und ergeben quasiäquivalente cp-Strukturen. Zusätzliche Hexamere können auch ringartig eingebunden werden, wodurch gestreckte Kapside wie beim Bakteriophagen Phi29 entstehen.^[97,98] Komplexe Viren weichen häufig von der ikosaedrischen Symmetrie ab; z. B. bildet das HIV-cp typischerweise konische, aber auch stabförmige Kapside.^[99]

3. Massenspektrometrie in der strukturellen Virologie

In diesem Abschnitt beschreiben wir, wie die biochemischen und -physikalischen Eigenschaften von Viren mit moderner MS untersucht werden können. Bevor wir uns auf einige interessante Fallstudien konzentrieren, wollen wir erst die verwendeten Schlüsseltechniken in vier Kästen zusammenfassen: „Proteomik“, „native und Ionenmobilitätsmassenspektrometrie“, „H/D-Austauschmassenspektrometrie“ und „chemische Markierungsverfahren, gekoppelt mit Massenspektrometrie“. Diese Kästen verweisen den Leser auf Hintergrundliteratur zu den einzelnen Methoden. Im Fall einer Anwendung zum Studium von Virusstruktur, -dynamik und -zusammenbau sind die mithilfe dieser vier Ansätze erhältlichen Informationen in Abbildung 4 zusammengefasst.

Kasten 1: Proteomik

MS-basierte Proteomik ist momentan die leistungsfähigste Methode, um Sequenzinformationen von Proteinen zu erhalten.^[6] Zur Sequenzierung werden in Proteomanalysen gemeinhin proteolytische Peptide durch stoßinduzierte Dissoziation (CID) und/oder Elektronentransferdissoziation (ETD) fragmentiert.^[100,101] Die Fragmentationsspektren werden anschließend mit großen Proteinsequenzdatenbanken abgeglichen, die vorhergesagte Spektren enthalten, die aus ständig aktualisierten Genom-/Proteindatenbanken abgeleitet werden.^[102] Außer zum Bestimmen von Proteinen kann MS-gestützte Proteomik auch zum Feststellen und Lokalisieren von natürlich vorkommenden posttranslationalen Modifikationen (wie Glycosylierungen,^[103] Phosphorylierungen,^[104] Lysin- und N-terminalen Acetylierungen)^[105] oder von chemischen Proteinmodifikationen (ausgelöst durch Vernetzungsreaktionen, Oberflächenkartierungen durch Oxidation,^[106] Acetylierung,^[107] oder Deuteriumeinbau usw.^[106]) genutzt werden. Zur Peptid-/Proteinidentifizierung ist die sehr selektive Protease Trypsin das Enzym der Wahl, wenngleich andere Enzyme an Beliebtheit gewinnen, besonders in Verbindung mit der ETD.^[108]

Kasten 2: Native und Ionenmobilitätsmassenspektrometrie

In der ESI-MS werden Moleküle durch einen kombinierten Prozess von Desolvatisierung und (De-)Protonierung

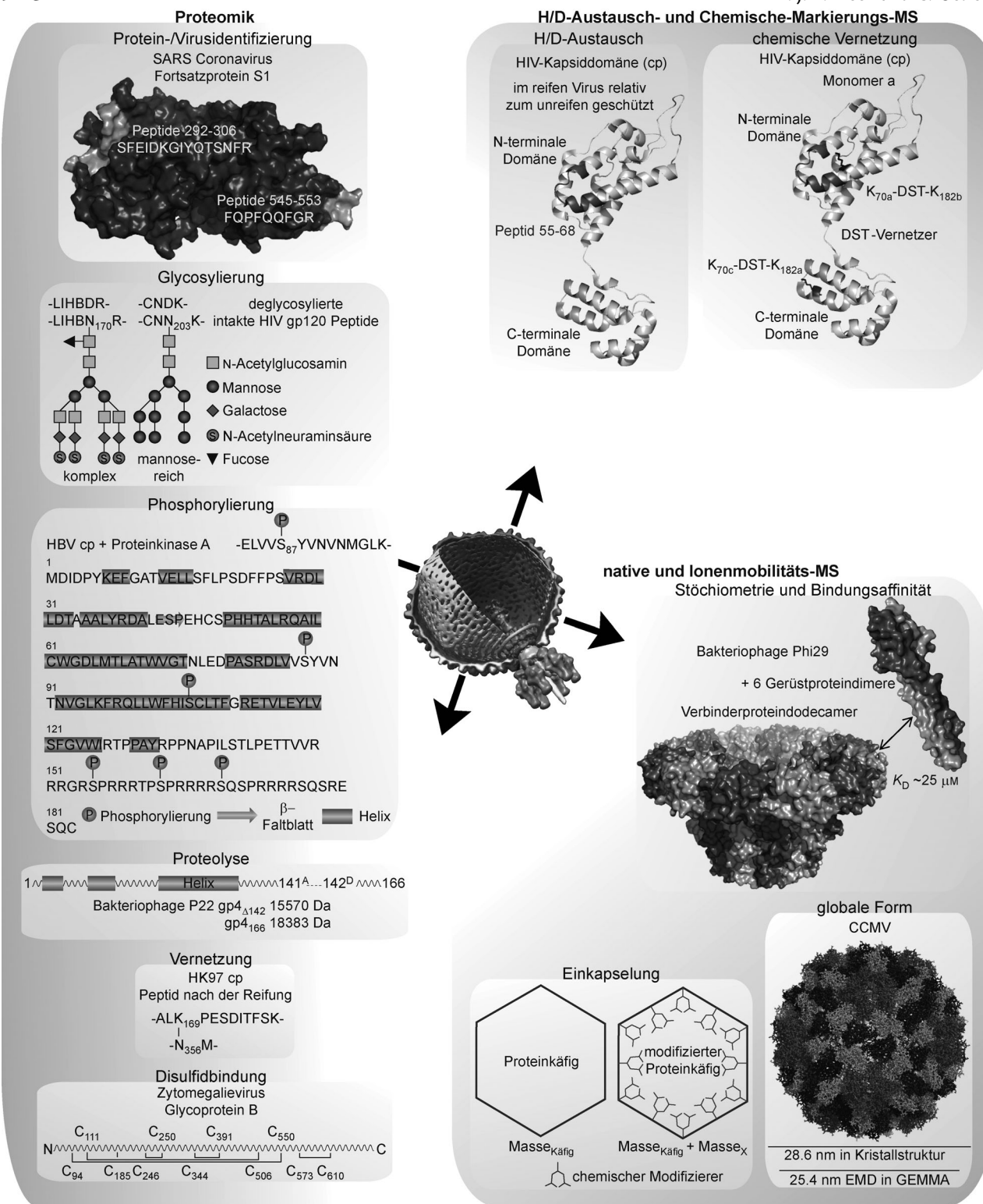


Abbildung 4. Anwendungen der Massenspektrometrie in der strukturellen Virologie: Beispiele, wie moderne MS in letzter Zeit zur strukturellen Virologie beigetragen hat. Dazu zählen Anwendungen der MS zur Virusproteinbestimmung, wie posttranslationale Modifikationen, und zur Strukturanalyse von Viren mit H/D-Austausch-MS sowie nativer und Ionenmobilitäts-MS. Im linken Teil der Abbildung ist von oben nach unten dargestellt, wie Proteomikansätze genutzt werden können, um die Zusammensetzung eines Virus zu prüfen. So konnten etwa die Proteine des SARS-Coronavirus frühzeitig mit MS identifiziert werden. Hier sind die nachgewiesenen Peptide des Fortsatzproteins S1 angegeben (auf dem Strukturmodell 1Q4Z eingezeichnet).^[142] Darunter sind die Ergebnisse der Kartierung der genauen Positionen des heterogenen Glycosylierungsmusters im Hauptoberflächenprotein des HIV,^[65] der multiplen Phosphorylierungsstellen des HBV-cp,^[156] der proteolytischen Spaltungsstelle des gp4 aus dem Bakteriophagen P22^[192] und der Positionen von Vernetzungen wie bei der HK97-Reifung mittels Proteomik abgebildet.^[67,164] Wie MS genutzt werden kann, um strukturell relevante Informationen zu gewinnen, ist auf der rechten Seite verdeutlicht; von oben nach unten: wie H/D-Austausch und chemische Markierung (z. B. Vernetzungen) genutzt wurden, um einen entscheidenden Schritt in der HIV-Kapsidreifung aufzuschlüsseln^[64] und wie native und Ionenmobilitäts-MS Informationen über die Stöchiometrie eines Aggregats liefern können – in vorteilhaften Situationen sogar die Bindungsaffinität,^[159] die Menge an eingekapseltem Material^[183] und die Form eines viralen Proteinkomplexes.^[171]

ionisiert. ESI ist am empfindlichsten bei niedrigen Flüssen (nL min^{-1}), und optimale Bedingungen werden durch Einbringen des Analyten in ein 1:1-Gemisch aus Wasser und organischem Lösungsmittel erhalten. Solche Lösungen sind gewöhnlich angesäuert, um die Protonierung zu fördern. Diese Lösungsbedingungen ermöglichen zwar einen hochempfindlichen Nachweis, führen aber typischerweise zur Denaturierung und Entfaltung von Proteinen. Das Ziel nativer MS ist es hingegen,^[21,22,109] die übergeordnete Proteinstruktur zu erhalten, um die Untersuchung von Proteinkonformation, -komplexologie und -dynamik zu ermöglichen. Daher sollten die Proben so nahe wie möglich an den physiologischen Bedingungen gehalten werden. Ein ESI-MS-kompatibler „volatiler Puffer“ steht mit wässrigem Ammoniumacetat bereit, wobei ein neutraler pH-Wert bewahrt und die Salzkonzentration von 5 mM bis 1 M variiert werden kann. Aus zahlreichen biophysikalischen Validierungsstudien ist deutlich geworden, dass viele Proteinquartärstrukturen unter diesen Bedingungen erhalten bleiben können. Während des ESI-Vorgangs verdampft der volatile Puffer leicht und erzeugt „nackte“ Proteinionen. Diese tragen dabei erheblich weniger Ladungen als beim Sprühen aus organischen ESI-Lösungsmitteln, da die Oberfläche in diesen gefalteten Spezies kompakter ist. Weil größere Proteinverbände m/z -Werte erreichen können, die einige Tausend überschreiten, werden entsprechende Flugzeitmassenanalysatoren (ToF) für den Nachweis benötigt.^[110,111] Die Erhaltung von Quartärstrukturen in der Gasphase bietet die Möglichkeit, die Masse von intakten Protein(unter)komplexen zu messen, woraus Informationen über Stöchiometrie und Topologie gewonnen werden können.^[19,112] Um die Struktur von Proteinkomplexen zu prüfen, können Unterkomplexe bewusst erzeugt werden, entweder durch Einsatz von niedrigen Konzentrationen an Denaturierungsmitteln, einer Verschiebung des pH-Wertes und/oder der Ionenstärke^[113] oder mithilfe von CID.^[114–116] Durch In-vitro-Rekonstitution von Membranproteinkomplexen in Micellen können sogar in Membranen eingebettete Proteinkomplexe mit nativer MS studiert werden.^[117] Eine weitere Stärke der nativen MS ist ihre hohe Empfindlichkeit, die auch die Analyse von endogen exprimierten Proteinkomplexen ermöglicht.^[118,119]

Das verfügbare Repertoire wurde kürzlich durch die Kopplung von Ionenmobilitätstrennung (IM) mit MS (IMMS) erweitert.^[120] In der IMMS werden Ionen nicht nur anhand ihres m/z -Wertes aufgetrennt, sondern auch innerhalb einer gasgefüllten Kammer entsprechend ihrer Driftzeit, die von ihrer generellen Form oder dem Kollisionsquerschnitt (Ω) abhängt. Normalerweise erfahren Moleküle mit größeren Ω -Werten, d.h. einem größerem scheinbaren Volumen, längere Driftzeiten. Anhand von IMMS-Daten kann der Ω -Wert oder die durchschnittliche Projektionsfläche eines Proteinkomplexes bestimmt werden. Erste Ergebnisse deckten auf, dass die Strukturen aus der Lösung besonders bei größeren Proteinkomplexen in der Gasphase weitestgehend erhalten bleiben.^[120,121] IMMS wird in diesem Zusammenhang vor allem in Verbindung mit Computermodellen gebraucht, um verbesserte Strukturmodelle von Proteinkomplexen zu erzeugen.^[113,122] Zum Beispiel kann bei Vorhandensein von hochaufgelösten Strukturen (Röntgenkristallographie oder

NMR-Spektroskopie) einzelner Proteinkomplexbestandteile der Ω -Wert des intakten Protein(unter)komplexes genutzt werden, um Strukturmodelle vorherzusagen.

Kasten 3: H/D-Austauschmassenspektrometrie

Bei der H/D-Austausch-MS wird die Einbindung von Deuteriumatomen ins Protein zeitlich verfolgt.^[123–127] Die Methode gründet auf dem Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium in lösungsmittelzugänglichen Rückgratamidgruppen, wenn ein Protein in deuteriertes Wasser (D_2O) überführt wird. Die folgende Zunahme der Proteinmasse im Laufe der Zeit wird mit MS gemessen. Unter Verwendung von intakter oder nativer MS kann der globale Austausch in einem Protein(komplex) abgebildet werden und Informationen über erhebliche Konformationsänderungen z.B. bei Ligandenbindung liefern.^[128] Die detaillierte Position des Deuteriumeinbaus kann über die Beobachtung der Massenverschiebung von Peptidfragmenten ermittelt werden, die nach der H/D-Austauschreaktion erzeugt werden. Darum werden die Proben über verschiedene Zeiträume in D_2O inkubiert und nachfolgend typischerweise bei niedrigen Temperaturen (0°C) durch Verdünnung angesäuert ($\text{pH} \approx 2.5$), um Rücktauschvorgänge zu verlangsamen. Leider können nur wenige Proteasen bei solchen pH-Werten Proteine ergiebig verdauen. Pepsin hat eine optimale Aktivität bei niedrigem pH-Wert und ist das bevorzugte Enzym für H/D-Austauschanwendungen. Obwohl Pepsin als eine unspezifische Protease anzusehen ist, sind die nachgewiesenen Peptide reproduzierbar.^[129] Nach dem Verdau werden die gewonnenen Peptide der MS-Analyse zugeführt und durch die genaue Masse und Fragmentationsmuster identifiziert. Die Massenverschiebung aufgrund von Deuteriumaufnahme kann dann zeitlich erfasst werden, um zu klären, welche Peptide an Strukturänderungen beteiligt sind, die bei Proteinkomplexbildung oder auch Virusreifung auftreten.^[66,130] H/D-Austausch mit MS-Kopplung ist zu einem nützlichen analytischen Hilfsmittel für das Studium der Proteindynamik geworden. Durch Kombinieren dieser Informationen mit klassischen funktionalen Daten lässt sich ein fundierteres Verständnis der Proteinfunktion erlangen. Der Ansatz der H/D-Austausch-MS ist ähnlich und wurde in Verbindung mit NMR-Experimenten genutzt, in denen der H/D-Austausch zeitlich verfolgt wird. Lange Zeit war die H/D-Austauschanalyse eher auf kleine Proteine oder Proteindomänen beschränkt, verbesserte Auflösung und Empfindlichkeit der Massenanalysatoren, kombiniert mit besserer Software zur Dateninterpretation, haben aber nun auch die Untersuchung großer Proteine, etwa ganzer Antikörper, ermöglicht.^[131]

Kasten 4: Chemische Markierungsverfahren, gekoppelt mit Massenspektrometrie

Außer dem H/D-Austausch gibt es noch eine Reihe weiterer, regelmäßig in Kombination mit MS eingesetzter chemischer Ansätze zum Überprüfen der Oberflächenzugänglichkeit und Interkonnektivität von Proteinen in Komplexen.^[132] Bei diesen Methoden werden spezifische Aminosäuren schnell und effizient unter pseudophysiologischen Be-

dingungen chemisch markiert. MS wird dann dazu verwendet, auf chemisch ausgelöste Massenverschiebungen in den Peptiden/Aminosäuren, die von der Markierung beeinflusst werden, zu prüfen. Die Grundidee ist, dass lediglich die zugänglichen Aminosäuren verändert werden, was die Abbildung von Konformationsänderungen in Proteinen etwa bei der Ligandenbindung oder Proteinkomplexbildung ermöglicht. Am beliebtesten im Bereich der Strukturbiochemie sind die oxidative Markierung mit Hydroxylradikalen^[133–135] oder die Markierung von frei zugänglichen Aminen unter anderem durch Acetylierung.^[107,132,136] Chemische Markierung unter Verwendung von Molekülen mit mindestens zwei reaktiven Gruppen kann auch zum Vernetzen spezifischer Aminosäuren angewendet werden, die sich in unmittelbarer Umgebung zueinander befinden. Solche Vernetzungsansätze nutzend, können intra- und intermolekulare Interaktionen in einem Proteinkomplex nachgewiesen werden.^[137–139] Die gängigsten difunktionellen Vernetzer richten sich gegen Lysinreste, wobei die Verbinderstärke und der Abstand zwischen den beiden reaktiven Gruppen den Bereich an Wechselwirkungen definiert, die untersucht werden können. Dies liefert Distanzbeschränkungen für Computermodelle. Nach der Modifikation der Proteine muss verbliebenes Reagens entfernt oder inaktiviert werden. Im Anschluss an die Proteolyse müssen Peptide, die von bestimmten vernetzten Bereichen der Proteine stammen, aus dem Hintergrund von unveränderten Peptiden herausgefiltert werden, wofür die passende Software eine Grundvoraussetzung ist.^[138,140] Beispielsweise wurden chemische Vernetzung und MS angewendet, um die Wechselwirkungen zwischen Untereinheiten des Prokapsids des Bakteriophagen P22 zu untersuchen.^[137]

3.1. Identifizierung von viralen Proteinen und ihrer posttranslationalen Modifikationen

Neue virale, ansteckende Pathogene lassen sich einwandfrei durch Genotypisierung charakterisieren.^[141] Allerdings liefern solche Experimente keine Informationen über die tatsächlich exprimierten viralen Proteine. Mithilfe von etablierten Proteomikmethoden (Kasten 1) können virale Proteine selbst in komplexen Proben wie Wirtszelllysaten leicht identifiziert werden. Solche Daten bieten in direkter Weise Informationen über die Zusammensetzung des Virions und können dessen Struktur- und Begleitproteine preisgeben.^[142] Ein erläuterndes Beispiel ist das SARS verursachende humane Coronavirus, das um 2003 in Asien aufkam. Alle vorhergesagten Strukturproteine wurden kurz nach dem Ausbruch durch MS nachgewiesen (Abbildung 4), wobei auch einige Glycosylierungs- und Phosphorylierungsstellen kartiert werden konnten.^[28,142,143] Mit einer Verzögerung von wenigen Jahren wurden diese Proteine unter Verwendung von hochauflösenden Techniken wie Röntgenkristallographie strukturell untersucht.^[144]

Quantitative Proteomikexperimente sind genutzt worden, um die dynamischen, zeitlichen Änderungen des Wirtproteoms im Zuge der Infektion mit einem Pathogen zu studieren, mit dem Ziel, das Wirt-Erreger-Interaktom zu entschlüsseln.^[145,146] Dazu wird oft eine Art von Isotopenmarkierung

angewendet, mithilfe derer Proteine mit einem durch die Infektion beeinflussten Expressionsgrad identifiziert werden. Solche Isotopenmarkierungen in Kombination mit Proteomik stellten Informationen zu den zellulären Änderungen bei einer SARS-Infektion bereit und ermöglichten die Identifizierung von Wirtszellfaktoren, die mutmaßlich an der Virusvermehrung beteiligt sind.^[147,148]

Oberflächenexponierte Virusproteine oder -proteindomänen vermitteln gewöhnlich die Anheftung des Virus an den Wirt. Bei umhüllten Viren wie HIV befinden sich diese Proteine in der Lipiddoppelschicht und sind typischerweise hochgradig glycosyliert. Diese Glycane sind wahrscheinlich an der Antigenität durch Abschirmung des Virus vom Immunsystem beteiligt. Die Stellen und insbesondere die Arten der Glycosylierungen werden massiv von Mutationen beeinflusst und behindern dadurch die Entwicklung von Impfstoffen gegen HIV.^[149] Proteomikmethoden sind genutzt worden, um die Hauptveränderungen des Glycosylierungsmusters zwischen verschiedenen Virusstämmen aufzudecken.^[150–152] Nach dem Peptidverdau bestimmt der Massenunterschied zwischen glycosylierten und enzymatisch deglycosylierten Proben die Größe der Kohlenhydrate. Mit Tandem-MS können die modifizierte Aminosäure und die Zusammensetzung des Glycans ermittelt werden.^[65,150,151] Die Dekoration von Virusproteinen mit Glycanen kann sehr komplex sein, da gebundene Kohlenhydrate normalerweise in Länge und Art variieren, wobei alle drei Strukturformen – mannosereich, komplex und gemischt – vorkommen und beim HIV-Protein gp120 nachgewiesen wurden (Abbildung 4). Vermutlich wegen der hohen strukturellen Flexibilität und Heterogenität der Glycanschicht konnte bisher lediglich eine deglycosylierte Variante von gp120 kristallisiert werden. Die Bindung von CD4- und Chemokinrezeptoren der humanen T-Zellen an gp120 wird anscheinend durch das Glycosylierungsmuster beeinflusst, was die Bedeutung dieser Art von Analyse hervorhebt.

Viruskapside können generell zwar durch Selbstorganisation zusammengebaut werden, allerdings findet man in vivo einen wesentlich komplexeren Aufbauprozess, der auch durch die Wirtszellmaschinerie gesteuert werden kann. So verstärkt etwa die Phosphorylierung von HBV-cp die Bildung von DNA aus RNA im sich aufbauenden Kapsid.^[153] Dies ist wahrscheinlich an vermehrten Kapsidzusammenbau und vermehrte Verkapselung von RNA gekoppelt, die nach Phosphorylierung mehrerer HBV-cp-Aminosäurereste beobachtbar sind.^[154–156] Proteomik und Mutagenesestudien eröffneten, dass die Wirtskinasen PKA und PKC jeweils einen von zwei mittleren Serinresten im HBV-cp phosphorylieren (Abbildung 4).^[155,156]

3.2. Beobachtung der Virusreifung

Proteine, die an viralen Aufbau- und Reifungsprozessen beteiligt sind, sind weniger anfällig für mutationsbedingte Änderungen als Oberflächenproteine und bieten sich daher als mögliche Ziele zur Intervention an. MS wurde nicht nur ausgiebig genutzt, um Virusstrukturen aufzuklären, sondern auch, um die dynamischen Veränderungen in diesen Struk-

turen über den gesamten viralen Lebenszyklus zu beobachten. Solche Modifikationen und Umlagerungen, die während des Virusaufbaus und der Reifung sowie auch der Infektion stattfinden können, sind traditionell mithilfe von fluoreszierenden Markierungen kartiert oder global mit spektroskopischen Techniken überwacht worden.^[157,158] Ferner haben sich Mutagenesestudien, wie Alaninabtastung, als sehr hilfreich erwiesen, um posttranslationale Modifikationen, die während der Reifung auftreten, zu charakterisieren und zu lokalisieren.^[67,155,159,160]

In einer eleganten Arbeit wurden MS-basierte Techniken mit Elektronenmikroskopie (EM) und Röntgenkristallographie kombiniert, um die Kapsidbildung und -reifung des ikosaedrischen Bakteriophagen HK97 zu untersuchen. Dieser lambdaoide Phage lagert seine dsDNA unter hohem Druck und benötigt daher eine stabile Kapsidstruktur sowie einen irreversiblen Aufbau, um das Genom zu schützen.^[68,161] Anfangs organisieren sich 420 cp-Untereinheiten zu Penta- und Hexameren. Diese Kapsomere bauen im Anschluss den kugelförmigen, dickwandigen Prokopf I auf (Abbildung 5). Die N-terminale Δ -Domäne fungiert als Gerüst und wird im Zuge der Reifung abgespalten. Dies führt zum Prokopf II. Solche Beispiele proteolytischer Spaltung wurden in vielen Viren beobachtet, und die genaue Spaltungsstelle kann mithilfe proteomikbasierter Methoden identifiziert werden (Abbildung 4).^[162] Ein entscheidender Schritt in der HK97-Reifung ist die Konformationsänderung, die zum dünnwandigen iko-

saedrischen Kapsid oder Phagenkopf führt. Diese Ausweitung wird gemeinhin von der DNA-Verpackung begleitet, kann aber auch in vitro in Abwesenheit der DNA und des Verpackungsapparates ausgelöst werden. In EM- und Kristallographiestudien wurden massive Strukturänderungen erkannt, die mit diesem Übergang verbunden sind. Die erreichte Auflösung war allerdings für einige Übergangsstrukturen begrenzt. H/D-Austausch-MS (Kasten 3) an den verschiedenen Intermediaten des Kopfaufbaus – vom Kapsomer bis zum beinahe reifen Kopf I – konnte präzise zeigen, welche Aminosäuren an den reifungsbegleitenden Änderungen beteiligt waren (Abbildung 5).^[66,130,163] Die nächste Stufe der Reifung ist die autokatalytische Vernetzung der cp-Einheiten, die das Kapsid in der geweiteten Konformation einsperrt. Das entscheidende Peptid, das die recht ungewöhnliche Lysin-Asparagin-Vernetzung trägt, konnte nach Proteolyse durch Trypsin mit MS bestimmt werden (Abbildung 4).^[67]

Typische inter- und intramolekulare Vernetzungen sind Disulfidbrücken, die gemeinhin in reifen Viren beobachtet werden. So sind etwa an der Stabilisierung des Zytomegalievirus-Glycoproteins B umfangreiche Disulfidbindungen beteiligt, die weitgehend durch MS kartiert wurden. Solche Disulfidvernetzungen sind unter den *Herpesviridae* offenbar gängig (Abbildung 4).^[164]

Ein anderer Ansatz, der üblicherweise genutzt wird, um Strukturänderungen oder Bindestellen zu identifizieren und kartieren, ist die chemische Vernetzung mit MS-Kopplung

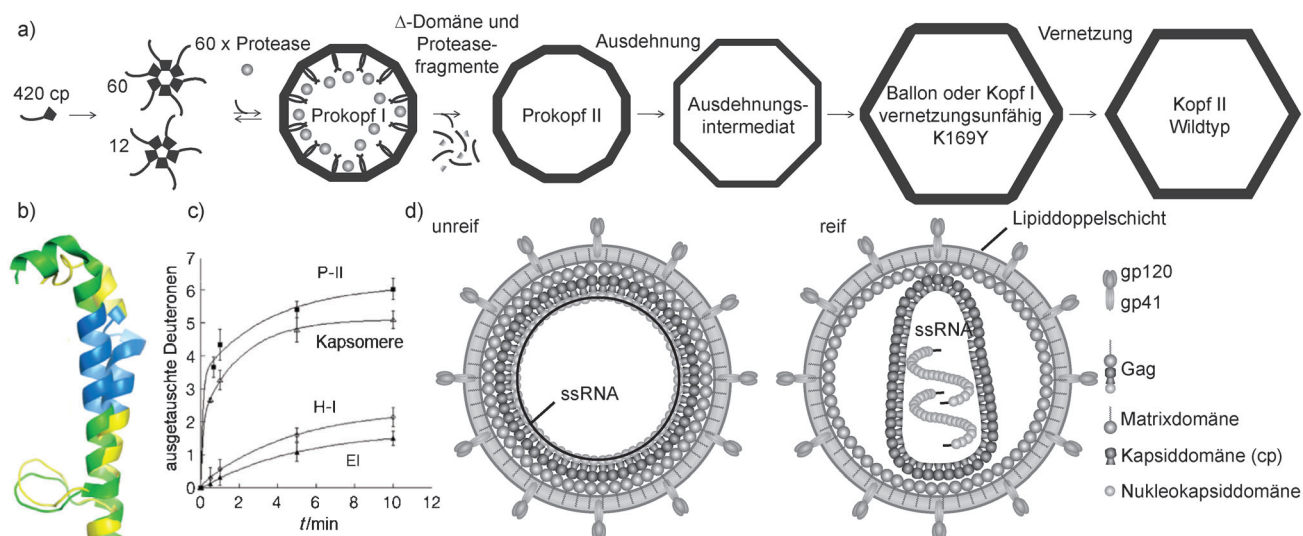


Abbildung 5. Massenspektrometrische Untersuchung der HK97- und HIV-Reifung: a) Das cp des Bakteriophagen HK97 lagert sich vorab zu Hexameren und Pentameren zusammen. Diese bilden anschließend zusammen mit der viralen Protease den Prokopf I. Der Aufbau wird durch die cp- Δ -Domäne vermittelt, die als Gerüst fungiert. Die Protease spaltet die Δ -Domäne und sich selbst. Dies führt zu Prokopf II und markiert den ersten unumkehrbaren Schritt in der Kapsidbildung. Unter bestimmten Bedingungen tritt die Ausdehnung auf, gefolgt vom zweiten irreversiblen Schritt, der autokatalytischen Vernetzung von cp-Untereinheiten. Der Kopf I einer vernetzungsunfähigen Mutante entspricht nahezu dem reifen Kopf II.^[66] b) Die Rückgrathelix aus der Kristallstruktur einer Untereinheit im Prokopf II (gelb) wurde entlang der gestreckten Helix im Kopf II derselben Untereinheit ausgerichtet. Ein Peptid, das mit H/D-Austausch (c) analysiert wurde, ist blau dargestellt. Wie aus den Austauschdaten in (c) hervorgeht, tritt die Streckung der Helix bereits beim Übergang vom Prokopf II (P-II) zum Ausdehnungsintermediat (EI) auf. Auch sind die Deuteronen dargestellt, die in die entsprechenden Peptidfragmente der freien Kapsomere und des Kopfes I (H-I) eingebaut wurden. Wiedergabe mit Genehmigung der Macmillan Publishers Ltd: Nature,^[66] 2009. d) Bei HIV umschließt das unreife Kapsid aus dem Gag-Polypeptid die (+)ssRNA und wird umhüllt. Nach Freisetzung aus der Zelle spaltet die virale Protease Gag in drei Hauptproteine und einige kleine Peptide. Die Matrixdomäne bleibt über einen Myristoylrest an die Lipidhülle gebunden, und die Nukleokapsiddomäne ist mit der ssRNA assoziiert. Eine Konformationsänderung im cp führt zu einem Zusammenbruch des sphärischen in ein konisches Kapsid. An diesem Punkt ist das Virus ansteckend. Andere Proteine, inklusive der Protease und Peptidfragmente, wurden der Klarheit halber weggelassen.^[64]

(Kasten 4).^[140,159,165] H/D-Austausch und chemische Vernetzung^[64,165–167] wurden kombiniert, um die pleiomorphen HIV-Kapside zu analysieren. Die variable Erscheinung verhindert die klassische hochauflösende Strukturbestimmung, da diese generell auf die Mittelung über viele Teilchen angewiesen ist.^[99]

Bei HIV baut sich das Gag-Polypeptid um die (+)ssRNA an der Plasmamembran auf. Nach dem Knospen der umhüllten Viren spaltet die im kugelförmigen unreifen Kapsid beheimatete Virusprotease das Gag-Protein. Die freigesetzten Domänen reorganisieren sich zum reifen Virus. Dann ist das Nukleokapsid innerhalb des nun kollabierten und konischen Kerns, der aus der Kapsidomäne (ab hier cp) gebildet wird, mit der RNA assoziiert, wogegen die Matrixdomäne über eine N-terminale Myristoylierung an die Hülle gebunden bleibt (Abbildung 5). Dieser Myristoylrest wurde ebenfalls mit MS in der Matrixdomäne virusähnlicher Partikel nachgewiesen. Dies belegt die Ähnlichkeit zum vollinfektösen Virus.^[166] Alaninabtastung identifizierte bereits bestimmte Stellen in den N- und C-terminalen Domänen des cp, die an der Bindung zwischen den Untereinheiten dieser homotypischen Domänen beteiligt sind. Allerdings wurde nur durch Anwendung von H/D-Austausch eine bis dahin unbekannte Position in der N-terminalen Region entdeckt, die bei in vitro zusammengesetzten sowie reifen Teilchen hochgradig geschützt war, sich hingegen im unreifen Kapsid vergleichbar zur freien cp-Untereinheit verhielt.^[166,167] Generell ist die cp-Anordnung für unterschiedliche HIV-Kapsidformen ähnlich. Ferner wurde durch chemische Vernetzung eine zuvor unbekannte Wechselwirkung zwischen der N- und C-terminalen Domäne benachbarter Monomere aufgeklärt (Abbildung 4). Dieser Kontakt treibt wahrscheinlich die Reifung voran und ist im Gag-Polypeptid geschützt oder blockiert.

Ein weiteres Beispiel, das auf den Virusaufbau ausgerichtet war, setzte auf H/D-Austausch-MS, um Regionen im cp-Dimer des MS2-Bakteriophagen zu lokalisieren, die Konformationsänderungen während der Bindung an eine Stammschleife genomischer ssRNA erfahren. Diese ist als Aufbauauslöser bekannt.^[168] Die Daten wiesen auf spezifische Bereiche in den cp-Dimeren hin, die ihre Austauschkinetiken in Gegenwart der RNA änderten, inklusive der bekannten RNA-Bindestellen.

3.3. Massenanalyse von intakten viralen Aggregaten

ESI-MS hat den verfügbaren Massenbereich für die Analyse von Biomolekülen erheblich erweitert; Meilensteine waren dabei Viren und ihre Kapside. Der erfolgreiche Transfer von TMV in die Gasphase mithilfe von ESI wurde bereits 1996 nachgewiesen.^[83] In diesen wegweisenden Studien verhinderte die Begrenzung der verwendeten Massenspektrometer eine genaue Massenbestimmung. Dennoch eröffneten die Sammlung der elektrosprayten TMV-Partikel und die anschließende EM-Analyse, dass die viralen Strukturen größtenteils erhalten blieben. Die im Massenspektrometer aufgetrennten TMV erwiesen sich sogar als infektiös. Seitdem wurden verschiedenste instrumentelle Aufbauten eingesetzt, um die Masse von Virusteilchen abzuschätzen.

Eine Kombination aus m/z und Ladungsdetektion in einem ToF-Analysator ergab für den TMV eine Masse von ungefähr 40 MDa mit einer Ungenauigkeit von 15%.^[169] ESI kann daher leicht genutzt werden, um Viren und virale Partikel zu ionisieren. Die akkurate Massenanalyse ist jedoch schwierig, wenn diese Teilchen zu groß oder zu heterogen werden. ESI wurde mit elektrophoretischen Gasphasenmobilitäts-Molekülanalysatoren (GEMMA) kombiniert.^[170,171] Darin wird die durch ESI produzierte, hohe Ladung der Teilchen wieder verringert, um einfach geladene Ionen zu erhalten, die anschließend anhand ihrer elektrophoretischen Mobilität aufgetrennt und vermessen werden. Eine GEMMA-Analyse wurde etwa erfolgreich beim 4.6 MDa schweren Augenbohnenvirus der chlorotischen Blattscheckung (CCMV) angewendet. Zwar ist die Massenaufklärung eines solchen Instruments noch immer zu gering, um die genaue Massenmessung zu ermöglichen, jedoch bietet GEMMA parallel Informationen über den elektrophoretischen Mobilitätsdurchmesser des analysierten Partikels. Solche Analysen gaben Hinweise darauf, dass die CCMV-Teilchen in der Gasphase ihre Quartärstruktur größtenteils behielten (Abbildung 4).^[170,171]

Eine erste genauere Massenermittlung wurde an intakten MS2-Partikeln durchgeführt, wobei die ESI-ToF-Analyse eine Bestimmung von teilweise aufgelösten Ladungszuständen ermöglichte.^[172] Daten von intakten viralen HBV-Kapsiden wurden mit zuvor unerreichter Auflösung durch Nutzung eines modifizierten Q-ToF-Instruments erhalten.^[110,173] HBV-Kapside sind außergewöhnlich, da sie sogar in vivo zwei unterschiedliche ikosaedrische Morphologien annehmen, die aus 90 und 120 Dimeren mit einer Gesamtmasse von ca. 3 bzw. 4 MDa bestehen. Die Massenspektren zeigten gut aufgetrennte Ladungszustandsverteilungen für beide Kapside an (Abbildung 6), ermöglichten eine Massenzuweisung auf 0.1 % genau und wiesen nach, dass beide Gitter vollständig waren. Die HBV-Kapside waren während des Transfers in die Gasphase und durch das Vakuum des Massenspektrometers erstaunlich stabil. Die Messung des Ω -Werts der Kapside mit IMMS ermöglichte die Abschätzung der Kapsidradien in guter Übereinstimmung mit den Abmessungen der Teilchen in der EM, die größtenteils erhalten gebliebene Struktur der Kapsidmorphologie in der Gasphase bestätigend.^[174] Obgleich sich die HBV-Kapside als sehr stabil erwiesen, wurde in Modellen vorgeschlagen, dass Dimere in den Partikeln mit den sehr selten vorkommenden, „freien“ cp-Dimeren in der Lösung austauschen. Native MS in Kombination mit CID an intakten HBV-Kapsiden wurde genutzt, um den Einbau der isotoptenmarkierten cp-Dimere in vorher gebildete, unmarkierte Kapside zu verfolgen. Ein langsamer Austausch über einen Zeitraum von Monaten konnte beobachtet werden, wenn auch nur für die 3-MDa-Teilchen und ausschließlich bei niedrigen Temperaturen,^[175] und erbrachte den experimentellen Nachweis für die theoretisch vorhergesagte „Kapsidatmung“.^[88]

Das noch größere (ca. 10 MDa) Noroviruskapsid erwies sich als weniger stabil. Die Neigung zur Dissoziation bei Veränderung des pH-Werts und der Ionenstärke wurde mit nativer MS abgebildet.^[176] Bei pH 6 in der Lösung wurde nur das intakte $T=3$ -Kapsid nachgewiesen, wenn auch mit nicht ausreichender Auflösung für eine genaue Massenbestimmung.

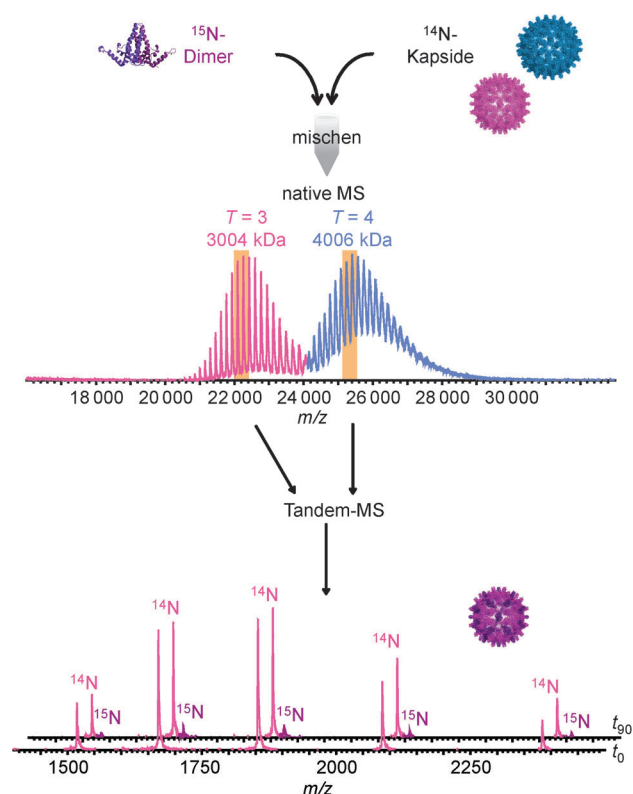


Abbildung 6. Kapsidatmung im HBV, abgebildet mit Tandem-MS. ^{15}N -markierte cp-Dimere von HBV wurden mit vorab gebildeten unmarkierten Kapsiden inkubiert. Zu festgelegten Zeitpunkten wurden native Massenspektren aufgenommen und entweder $T=3$ - oder $T=4$ -Kapside des HBV für die CID ausgewählt. Untereinheiten austausch wurde in den $T=3$ -Kapsiden nach ausgedehnten Perioden beobachtet, wie anhand des auftauchenden Signals markierter Monomere beurteilt wurde, die aus den Kapsiden in der Tandem-MS ausgestoßen wurden. Wiedergabe aus Lit. [175] mit Genehmigung der PCCP-Eigentümergeellschaften.

mung. Niedrigere pH-Werte führten vornehmlich zu cp-Dimeren. Interessanterweise bildeten sich im Basischen höher geordnete Oligomere, bevorzugt bei hohen Ionenstärken. Bemerkenswert war die vollständige Reversibilität des Übergangs zwischen $T=3$ -Partikeln und den anderen Oligomeren. Die größeren Oligomere entstanden höchstwahrscheinlich durch Dissoziation der $T=3$ -Kapside in Dimere und anschließenden Wiederaufbau. Die Hauptprodukte dieses Weges wurden als 60- und 80-mere identifiziert, wenngleich unter bestimmten Bedingungen auch kleinere Oligomere auftraten (Abbildung 7). Atomkraftmikroskopie (AFM)^[176] und auch vorherige EM-Studien^[177] bestätigten, dass im Basischen $T=1$ -Noroviruskapside aus 60 cp-Untereinheiten gebildet werden können. Ionenstärke und pH-Wert können daher das Noroviruskapsid in verschiedene Morphologien zwingen und machen dieses so zu einem idealen Modellsystem für Studien zum Kapsidaufbau und -abbau.

Ihr geringes Vorkommen und ihre Kurzlebigkeit erschweren die Untersuchung der möglichen oligomeren Intermediate, die während des Virusaufbaus zwischen dem Zustand des üblicherweise dimeren Bausteins und dem intakten Kapsid auftreten. Das nukleierende Intermediat bildet

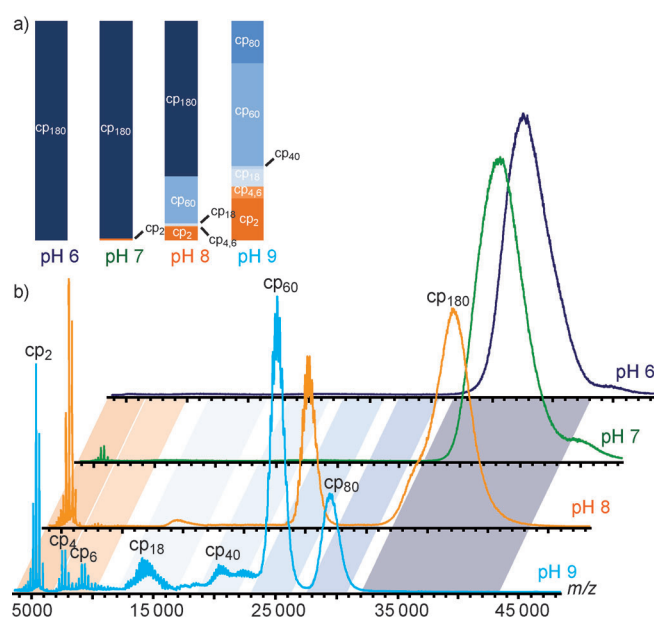


Abbildung 7. Kapsidstabilität und -morphologie des Norovirus in Abhängigkeit vom pH-Wert. ESI-MS-Analyse von Noroviruskapsiden, inkubiert bei pH 6–9. Die Häufigkeiten der verschiedenen cp-Oligomere sind als Balkendiagramme dargestellt (a). Die Diagramme und Massenspektren (b) lassen darauf schließen, dass das Kapsid (cp_{180}) im Basischen instabil ist. Die dissoziierten Dimere bilden größere Oligomere (bis zu 80 Untereinheiten) bei pH > 7 und hoher Ionenstärke. Adaptiert aus Lit. [176] der American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

sich wahrscheinlich langsam, wogegen die folgende Anlagerung von Bausteinen schnell zur Kapsidvollendung voranschreitet (Abbildung 3). Die hohe Empfindlichkeit nativer IMMS wurde genutzt, um eine breite Vielfalt an intermediären Oligomeren des Norovirus und HBV, die mit der intakten Kapsidform gemeinsam vorkommen, nachzuweisen und strukturell zu charakterisieren.^[178] In Verbindung mit Computermodellen konnte die Form dieser Übergangszustände untersucht werden, und es wurde gefunden, dass sie alle eine ausgedehnte, flächige Struktur aufweisen, wie für Übergangszustände zu erwarten wäre. Ferner konnten die vorhergesagten Aufbau nuklei des Norovirus- (Decamer) und HBV-Kapsids (Hexamer) anhand der MS-Daten bestätigt werden. Ein Aufbaupfad, der beiden Viren gemein ist, wurde vorgeschlagen.^[178]

Im Falle des MS2-Bakteriophagen sind die Aufbauwege durch die gebundene RNA eingeschränkt. Der Einbau längerer RNA-Abschnitte bevorzugt den Aufbau entlang der dreifachen (C_3 -)Achse. In entscheidender Weise wird die Ergiebigkeit des Aufbaus dabei nicht nur vom polyanionischen Charakter, sondern auch von der Sequenz der RNA beeinflusst.^[179] Das Vorkommen zweier Hauptintermediate wurde in Gegenwart verschiedener RNAs mit MS zeitlich verfolgt und mithilfe kinetischer Modelle interpretiert.^[180] Der normale, proteinzentrische Blickwinkel scheint eher vereinfacht zu sein. Weiterhin wurde die Struktur der beiden Intermediate mit IMMS ermittelt, sowohl von den intakten als auch von den CID-fragmentierten Spezies.^[181] Beide

hatten eine ausgedehnte, ringförmige Topologie, wie die Norovirus- und HBV-Oligomere.

Für Anwendungen in der Nanotechnologie sind nicht nur die Integrität, sondern auch die dynamischen Eigenschaften (wie der reversible Aufbau) der Kapside wichtig. Die Kenntnis solcher Fähigkeiten ist entscheidend, will man die Partikel gezielt modifizieren und Reaktionen von eingekapseltem Material fördern. Eine begrenzte Proteolyse in Verbindung mit MS an intakten Kapsiden deckte z. B. die dynamische Natur der cp im Flockhousevirus und CCMV auf, wobei cp-Bereiche, die im Inneren lokalisiert sind, vorübergehend nach außen exponiert werden.^[91,182] Der Einbau von Material in Kapside und die Modifizierung selbiger sowie anderer Proteinkäfige nutzt solche dynamischen Eigenschaften. Massenverschiebungen, die durch die Funktionalisierung von Viruspartikeln oder die Erzeugung von gemischten Anordnungen ausgelöst werden, können leicht mit MS gemessen werden und stellen ein Hilfsmittel zur Verfügung, um die Reaktion zu verfolgen und die Produktqualität zu kontrollieren (Abbildung 4).^[183–185] Dendrimere, die kovalent an die Innenseite eines Proteinkäfigs gebunden sind, können zu nachfolgenden Generationen herangezogen werden. Dabei können die Partikel ihre Stabilität erhöhen und damit eine Anwendung unter extremeren Bedingungen ermöglichen. Die Möglichkeit, die eingeschlossenen Dendrimere gezielt zu modifizieren, erhöht die Nutzbarkeit für bildgebende Verfahren weiter.^[183]

4. Ausblick

MS hat sich zu einer Technik entwickelt, die wichtige Einblicke in Struktur- und Funktionsaspekte von Proteinen und Proteinkomplexen liefert, wie für die hier beschriebenen viralen Kapside und Viren. In diesem Aufsatz war der Blick auf die strukturelle Virologie gerichtet, allerdings sind die Anwendungsbereiche nicht auf dieses Gebiet begrenzt: Elegante Arbeiten wurden auch an Ribosomen,^[17] RNA-Polymerasen^[114] und Proteasomen durchgeführt.^[186,187] Weitere Verbesserungen in massenspektrometrischen Analysatoren und Ionisationstechniken werden das Feld weiter vorantreiben; der größte Fortschritt wird in naher Zukunft jedoch höchstwahrscheinlich von der Kopplung der MS mit anderen Techniken herrühren, z. B. Computermodellen, Mikroskopie und Spektroskopie.

Die Erstellung von Strukturmodellen von Proteinkomplexen ist noch kaum entwickelt, teilweise durch die Größe der zu modellierenden Teilchen bedingt. Die Fortschritte der letzten Jahre, z. B. bei der Modellierung des Kernporenkomplexes der Hefe,^[188] könnten sich jedoch übertragen lassen und von Ω -Werten sowie topologischen Daten aus nativer IMMS an Protein(unter)komplexen profitieren.

Die Kopplung von MS mit EM oder AFM könnte in zwei Richtungen funktionieren: Zum einen können die Massenspektrometrien als Probenaufreinigungsschritt mittels sanfter Landung verwendet werden, um die gewünschten Teilchen auszuwählen, die weiter durch EM und AFM strukturell charakterisiert werden könnten.^[189] Auf diesem Wege könnten seltene Intermediate des viralen Aufbaus eingefangen

und mit mikroskopischen Techniken studiert werden. Zum anderen könnten EM- und AFM-Methoden eingesetzt werden, um gezielt Organellen oder sogar Proteinkomplexe aus ihrer natürlichen zellulären Umgebung „herauszugreifen“ und diese anschließend dem Massenspektrometer zur Identifizierung und/oder Strukturanalyse zuzuführen.^[190]

Eine andere bahnbrechende Neuentwicklung, die in naher Zukunft verfügbar sein könnte, nutzt ultrakurze und intensive Röntgenlaserblitze, um hochaufgelöste Strukturen von individuellen Proteinkomplexen in der Gasphase zu erhalten.^[191] Solch eine Methode wäre ergänzend zu den hier beschriebenen nativen MS- und IMMS-Ansätzen und könnte höher aufgelöste Strukturinformationen bereitstellen, die direkt mit den Strukturdaten der gelösten Phase von konventionellen strukturellen Techniken, wie NMR-Spektroskopie, Röntgenkristallographie und EM, vergleichbar wären. Wir erleben hochinteressante Zeiten in der biomolekularen Massenspektrometrie!

Abkürzungen

CID	stoßinduzierte Dissoziation
cp	Kapsidprotein
ds	doppelsträngig
EM	Elektronenmikroskopie
ESI	Elektrospray-Ionisation
HBV	Hepatitis-B-Virus
HIV	humanes Immundefizienzvirus
TMV	Tabakmosaikvirus
CCMV	Augenbohnenvirus der chlorotischen Blattscheckung
IM	Ionenmobilität
IMMS	Ionenmobilitätsmassenspektrometrie
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
NVLP	norovirusartiges Partikel
Q	Quadrupol
ss	einzelsträngig
ToF	Flugzeit

Wir danken allen Kollegen im Heck-Labor, besonders der Native-MS-Gruppe, die einen Teil zur hier beschriebenen Forschung beigetragen hat. Weiterhin möchten wir auch unseren Kooperationspartnern danken, durch die wir das spannende Feld der strukturellen Virologie betreten haben. Auf die Gefahr hin, fälschlicherweise Personen auszulassen, möchten wir besonders Norman R. Watts, Paul T. Wingfield und Alasdair C. Steven vom NIAMS, Mary K. Estes, B. V. Venkataram Prasad vom Baylor College of Medicine, Peter E. Prevelige von der University of Alabama, Gino Cingolani von der Thomas Jefferson University, Jack E. Johnson vom Scripps Research Institute sowie Wouter H. Roos und Gijs J. L. Wuite von der Vrije Universiteit Amsterdam erwähnen. Diese Arbeit wurde vom Netherlands Proteomics Centre und der Niederländischen Organisation für wissenschaftliche Forschung durch ALW-ECHO-Fördermittel (819.02.10) an A.J.R.H. un-

terstützt. Ein besonderer Dank geht auch an Kristina Lorenzen, die an der Übersetzung mitgewirkt hat.

Eingegangen am 22. Dezember 2010

Online veröffentlicht am 26. Juli 2011

- [1] A. O. Nier, *J. Chem. Educ.* **1989**, 66, 385.
- [2] H. Budzikiewicz, C. Djerassi, D. H. Williams, *Interpretation of mass spectra of organic compounds*, Holden-Day, San Francisco, **1964**.
- [3] M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **1988**, 60, 2299.
- [4] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science* **1989**, 246, 64.
- [5] S. K. Chowdhury, V. Katta, B. T. Chait, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, 167, 686.
- [6] R. Aebersold, M. Mann, *Nature* **2003**, 422, 198.
- [7] K. Dettmer, P. A. Aronov, B. D. Hammock, *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, 26, 51.
- [8] K. Chughtai, R. M. Heeren, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 3237.
- [9] Z. Takats, J. M. Wiseman, B. Gologan, R. G. Cooks, *Science* **2004**, 306, 471.
- [10] J. B. Fenn, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 3999; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 3871.
- [11] V. Katta, B. T. Chait, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 8534.
- [12] M. C. Fitzgerald, I. Chernushevich, K. G. Standing, C. P. Whitman, S. B. Kent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 6851.
- [13] X. J. Tang, C. F. Brewer, S. Saha, I. Chernushevich, W. Ens, K. G. Standing, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, 8, 750.
- [14] K. J. Light-Wahl, J. A. Loo, C. G. Edmonds, R. D. Smith, H. E. Witkowska, C. H. Shackleton, C. S. Wu, *Biol. Mass Spectrom.* **1993**, 22, 112.
- [15] J. A. Loo, *Mass Spectrom. Rev.* **1997**, 16, 1.
- [16] A. A. Rostom, P. Fucini, D. R. Benjamin, R. Juenemann, K. H. Nierhaus, F. U. Hartl, C. M. Dobson, C. V. Robinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 5185.
- [17] D. R. Benjamin, C. V. Robinson, J. P. Hendrick, F. U. Hartl, C. M. Dobson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 7391.
- [18] J. L. Benesch, C. V. Robinson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, 16, 245.
- [19] M. Sharon, C. V. Robinson, *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, 76, 167.
- [20] W. J. van Berkel, R. H. van den Heuvel, C. Versluis, A. J. Heck, *Protein Sci.* **2000**, 9, 435.
- [21] A. J. Heck, R. H. Van den Heuvel, *Mass Spectrom. Rev.* **2004**, 23, 368.
- [22] R. H. van den Heuvel, A. J. Heck, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, 8, 519.
- [23] N. F. Steinmetz, T. Lin, G. P. Lomonosoff, J. E. Johnson, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2009**, 327, 23.
- [24] P. Singh, M. J. Gonzalez, M. Manchester, *Drug Dev. Res.* **2006**, 67, 23.
- [25] S. Mitragotri, J. Lahann, *Nat. Mater.* **2009**, 8, 15.
- [26] T. Dokland, *Structure* **2000**, 8, R157.
- [27] V. L. Morton, P. G. Stockley, N. J. Stonehouse, A. E. Ashcroft, *Mass Spectrom. Rev.* **2008**, 27, 575.
- [28] O. Krokhin, Y. Li, A. Andonov, H. Feldmann, R. Flick, S. Jones, U. Stroeder, N. Bastien, K. V. Dasuri, K. Cheng, J. N. Simonsen, H. Perreault, J. Wilkins, W. Ens, F. Plummer, K. G. Standing, *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, 2, 346.
- [29] T. Pe'ery, M. B. Mathews in *Fields Virology*, Vol. 1, 5. Aufl. (Hrsg.: D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, **2007**.
- [30] J. M. Claverie, C. Abergel, *Annu. Rev. Genet.* **2009**, 43, 49.
- [31] A. C. Steven, J. F. Conway, N. Cheng, N. R. Watts, D. M. Belnap, A. Harris, S. J. Stahl, P. T. Wingfield, *Adv. Virus Res.* **2005**, 64, 125.
- [32] M. W. Beijerinck, *Verh. Akad. Wet. Amsterdam Afd. Natuurkd. Sect. 1* **1898**, 6, 3.
- [33] C. M. Lawrence, S. Menon, B. J. Eilers, B. Bothner, R. Khayat, T. Douglas, M. J. Young, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 12599.
- [34] M. N. Pearson, R. E. Beever, B. Boine, K. Arthur, *Mol. Plant Pathol.* **2009**, 10, 115.
- [35] H. W. Ackermann, A. M. Kropinski, *Res. Microbiol.* **2007**, 158, 555.
- [36] R. S. Nelson, V. Citovsky, *Plant Physiol.* **2005**, 138, 1809.
- [37] J. Mercer, M. Schelhaas, A. Helenius, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, 79, 803.
- [38] T. Yamada, H. Onimatsu, J. L. Van Etten, *Adv. Virus Res.* **2006**, 66, 293.
- [39] C. A. Suttle, *Nature* **2005**, 437, 356.
- [40] D. Moreira, P. Lopez-Garcia, *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, 7, 306.
- [41] B. La Scola, C. Desnues, I. Pagnier, C. Robert, L. Barrassi, G. Fournous, M. Merchat, M. Suzan-Monti, P. Forterre, E. Koonin, D. Raoult, *Nature* **2008**, 455, 100.
- [42] E. V. Koonin, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, 1178, 47.
- [43] P. Forterre, D. Prangishvili, *Res. Microbiol.* **2009**, 160, 466.
- [44] R. C. Condit in *Fields Virology*, Vol. 1, 5. Aufl. (Hrsg.: D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, **2007**.
- [45] C. M. Fauquet, D. Fargette, *Virology* **2005**, 2, 64.
- [46] F. Rohwer, R. Edwards, *J. Bacteriol.* **2002**, 184, 4529.
- [47] M. H. van Regenmortel, B. W. Mahy, *Emerging Infect. Dis.* **2004**, 10, 8.
- [48] S. C. Harrison in *Fields Virology*, Vol. 1, 5. Aufl. (Hrsg.: D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, **2007**.
- [49] J. M. White, S. E. Delos, M. Brecher, K. Schornberg, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2008**, 43, 189.
- [50] J. T. Huiskonen, S. J. Butcher, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2007**, 17, 229.
- [51] D. A. Marvin, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, 8, 150.
- [52] P. Grayson, I. J. Molineux, *Curr. Opin. Microbiol.* **2007**, 10, 401.
- [53] G. R. Whittaker, M. Kann, A. Helenius, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2000**, 16, 627.
- [54] M. R. Denison, *PLoS Biol.* **2008**, 6, e270.
- [55] H. Brussow, C. Canchaya, W. D. Hardt, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2004**, 68, 560.
- [56] A. B. Oppenheim, O. Kobiler, J. Stavans, D. L. Court, S. Adhya, *Annu. Rev. Genet.* **2005**, 39, 409.
- [57] F. Bushman, M. Lewinski, A. Ciuffi, S. Barr, J. Leipzig, S. Hannehalli, C. Hoffmann, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, 3, 848.
- [58] C. Netherton, K. Moffat, E. Brooks, T. Wileman, *Adv. Virus Res.* **2007**, 70, 101.
- [59] S. Sun, V. B. Rao, M. G. Rossmann, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, 20, 114.
- [60] J. T. Patton, R. Vasquez-Del Carpio, M. A. Tortorici, Z. F. Taraporewala, *Adv. Virus Res.* **2007**, 69, 167.
- [61] R. Patient, C. Hourieux, P. Roingeard, *Cell. Microbiol.* **2009**, 11, 1561.
- [62] B. J. Chen, R. A. Lamb, *Virology* **2008**, 372, 221.
- [63] I. N. Wang, D. L. Smith, R. Young, *Annu. Rev. Microbiol.* **2000**, 54, 799.
- [64] J. Lanman, P. E. Prevelige, Jr., *Adv. Virus Res.* **2005**, 64, 285.
- [65] J. M. Cutalo, L. J. Deterding, K. B. Tomer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, 15, 1545.
- [66] I. Gertsman, L. Gan, M. Guttman, K. Lee, J. A. Speir, R. L. Duda, R. W. Hendrix, E. A. Komives, J. E. Johnson, *Nature* **2009**, 458, 646.
- [67] R. L. Duda, J. Hempel, H. Michel, J. Shabanowitz, D. Hunt, R. W. Hendrix, *J. Mol. Biol.* **1995**, 247, 618.

- [68] A. C. Steven, J. B. Heymann, N. Cheng, B. L. Trus, J. F. Conway, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 227.
- [69] M. K. Estes, B. V. Prasad, R. L. Atmar, *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2006**, *19*, 467.
- [70] S. R. Casjens, *Curr. Opin. Microbiol.* **2005**, *8*, 451.
- [71] H. L. Yen, R. G. Webster, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2009**, *333*, 3.
- [72] D. L. Caspar, A. Klug, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1962**, *27*, 1.
- [73] A. Zlotnick, *J. Mol. Recognit.* **2005**, *18*, 479.
- [74] J. E. Johnson, W. Chiu, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2007**, *17*, 237.
- [75] R. Wetzel, *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 671.
- [76] R. Zandi, P. van der Schoot, D. Reguera, W. Kegel, H. Reiss, *Biophys. J.* **2006**, *90*, 1939.
- [77] M. F. Hagan, O. M. Elrad, *Biophys. J.* **2010**, *98*, 1065.
- [78] P. G. Stockley, O. Rolfsson, G. S. Thompson, G. Basnak, S. Francese, N. J. Stonehouse, S. W. Homans, A. E. Ashcroft, *J. Mol. Biol.* **2007**, *369*, 541.
- [79] A. Zlotnick, *J. Mol. Biol.* **2007**, *366*, 14.
- [80] A. Zlotnick, P. Ceres, S. Singh, J. M. Johnson, *J. Virol.* **2002**, *76*, 4848.
- [81] A. Kivenson, M. F. Hagan, *Biophys. J.* **2010**, *99*, 619.
- [82] M. F. Hagan, *J. Chem. Phys.* **2009**, *130*, 114902.
- [83] G. Siuzdak, B. Bothner, M. Yeager, C. Brugidou, C. M. Fauquet, K. Hoey, C. M. Chang, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 45.
- [84] M. L. Flenniken, M. Uchida, L. O. Liepold, S. Kang, M. J. Young, T. Douglas, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2009**, *327*, 71.
- [85] M. Newman, F. M. Suk, M. Cajimat, P. K. Chua, C. Shih, *J. Virol.* **2003**, *77*, 12950.
- [86] S. Singh, A. Zlotnick, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 18249.
- [87] W. H. Roos, G. L. Wuite, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 1187.
- [88] P. Ceres, A. Zlotnick, *Biochemistry* **2002**, *41*, 11525.
- [89] J. K. Hilmer, A. Zlotnick, B. Bothner, *J. Mol. Biol.* **2008**, *375*, 581.
- [90] N. Reisdorph, J. J. Thomas, U. Katpally, E. Chase, K. Harris, G. Siuzdak, T. J. Smith, *Virology* **2003**, *314*, 34.
- [91] B. Bothner, X. F. Dong, L. Bibbs, J. E. Johnson, G. Siuzdak, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 673; B. Bothner, A. Schneemann, D. Marshall, V. Reddy, J. E. Johnson, G. Siuzdak, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 114.
- [92] K. N. Parent, M. M. Suhanovsky, C. M. Teschke, *J. Mol. Biol.* **2007**, *365*, 513.
- [93] A. Klug, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **1999**, *354*, 531.
- [94] W. K. Kegel, P. van der Schoot, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 1501.
- [95] X. Zhang, L. Jin, Q. Fang, W. H. Hui, Z. H. Zhou, *Cell* **2010**, *141*, 472.
- [96] J. Vellinga, S. Van der Heijdt, R. C. Hoeben, *J. Gen. Virol.* **2005**, *86*, 1581.
- [97] K. H. Choi, M. C. Morais, D. L. Anderson, M. G. Rossmann, *Structure* **2006**, *14*, 1723.
- [98] M. F. Moody, *J. Mol. Biol.* **1999**, *293*, 401.
- [99] B. K. Ganser-Pornillos, U. K. von Schwedler, K. M. Stray, C. Aiken, W. I. Sundquist, *J. Virol.* **2004**, *78*, 2545.
- [100] R. A. Zubarev, D. M. Horn, E. K. Fridriksson, N. L. Kelleher, N. A. Kruger, M. A. Lewis, B. K. Carpenter, F. W. McLafferty, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 563.
- [101] J. E. Syka, J. J. Coon, M. J. Schroeder, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 9528.
- [102] R. G. Sadygov, D. Cociorva, J. R. Yates, 3rd, *Nat. Methods* **2004**, *1*, 195.
- [103] B. Tissot, S. J. North, A. Ceroni, P. C. Pang, M. Panico, F. Rosati, A. Capone, S. M. Haslam, A. Dell, H. R. Morris, *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 1728.
- [104] P. A. Grimsrud, D. L. Swaney, C. D. Wenger, N. A. Beauchene, J. J. Coon, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 105.
- [105] N. Mischerikow, A. J. Heck, *Proteomics* **2011**, *11*, 571.
- [106] L. Konermann, D. A. Simmons, *Mass Spectrom. Rev.* **2003**, *22*, 1.
- [107] A. Scholten, N. F. Visser, R. H. van den Heuvel, A. J. Heck, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, *17*, 983.
- [108] N. Taouatas, M. M. Drugan, A. J. Heck, S. Mohammed, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 405.
- [109] A. J. Heck, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 927.
- [110] R. H. van den Heuvel, E. van Duijn, H. Mazon, S. A. Synowsky, K. Lorenzen, C. Versluis, S. J. Brouns, D. Langridge, J. van der Oost, J. Hoyes, A. J. Heck, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7473.
- [111] J. L. Benesch, B. T. Ruotolo, F. Sobott, J. Wildgoose, A. Gilbert, R. Bateman, C. V. Robinson, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 1270.
- [112] T. Taverner, H. Hernandez, M. Sharon, B. T. Ruotolo, D. Matak-Vinkovic, D. Devos, R. B. Russell, C. V. Robinson, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 617.
- [113] S. R. Geiger, K. Lorenzen, A. Schrieck, P. Hanecker, D. Kostrewa, A. J. Heck, P. Cramer, *Mol. Cell* **2010**, *39*, 583.
- [114] K. Lorenzen, A. Vannini, P. Cramer, A. J. Heck, *Structure* **2007**, *15*, 1237.
- [115] E. van Duijn, D. A. Simmons, R. H. van den Heuvel, P. J. Bakkes, H. van Heerikhuizen, R. M. Heeren, C. V. Robinson, S. M. van der Vies, A. J. Heck, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4694.
- [116] J. L. Benesch, J. A. Aquilina, B. T. Ruotolo, F. Sobott, C. V. Robinson, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 597.
- [117] N. P. Barrera, N. Di Bartolo, P. J. Booth, C. V. Robinson, *Science* **2008**, *321*, 243.
- [118] S. A. Synowsky, R. H. van den Heuvel, S. Mohammed, P. W. Pijnappel, A. J. Heck, *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5*, 1581.
- [119] S. A. Synowsky, M. van Wijk, R. Raijmakers, A. J. Heck, *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 1300.
- [120] C. Uetrecht, R. J. Rose, E. van Duijn, K. Lorenzen, A. J. Heck, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1633.
- [121] B. T. Ruotolo, K. Giles, I. Campuzano, A. M. Sandercock, R. H. Bateman, C. V. Robinson, *Science* **2005**, *310*, 1658.
- [122] T. L. Pukala, B. T. Ruotolo, M. Zhou, A. Politis, R. Stefanescu, J. A. Leary, C. V. Robinson, *Structure* **2009**, *17*, 1235.
- [123] L. Wang, L. C. Lane, D. L. Smith, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 1234.
- [124] L. Wang, D. L. Smith, *Protein Sci.* **2005**, *14*, 1661.
- [125] C. S. Maier, M. L. Deinzer, *Methods Enzymol.* **2005**, *402*, 312.
- [126] J. R. Engen, D. L. Smith, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 256 A.
- [127] T. E. Wales, J. R. Engen, *Mass Spectrom. Rev.* **2006**, *25*, 158.
- [128] V. Alverdi, H. Mazon, C. Versluis, W. Hemrika, G. Esposito, R. van den Heuvel, A. Scholten, A. J. Heck, *J. Mol. Biol.* **2008**, *375*, 1380.
- [129] A. Sinz, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 425.
- [130] I. Gertsman, C. Y. Fu, R. Huang, E. Komives, J. E. Johnson, *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9*, 1752.
- [131] D. Houde, Y. Peng, S. A. Berkowitz, J. R. Engen, *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9*, 1716.
- [132] V. L. Mendoza, R. W. Vachet, *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, *28*, 785.
- [133] G. Xu, M. R. Chance, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3514.
- [134] L. Konermann, B. B. Stocks, Y. Pan, X. Tong, *Mass Spectrom. Rev.* **2010**, *29*, 651.
- [135] B. C. Gau, J. S. Sharp, D. L. Rempel, M. L. Gross, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 6563.
- [136] D. Suckau, M. Mak, M. Przybylski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5630.
- [137] S. Kang, A. M. Hawkrigde, K. L. Johnson, D. C. Muddiman, P. E. Prevelige, Jr., *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 370.
- [138] A. Leitner, T. Walzthoeni, A. Kahraman, F. Herzog, O. Rinner, M. Beck, R. Aebersold, *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9*, 1634.
- [139] A. Sinz, *Mass Spectrom. Rev.* **2006**, *25*, 663.
- [140] S. Kang, L. Mou, J. Lanman, S. Velu, W. J. Brouillette, P. E. Prevelige, Jr., *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **2009**, *23*, 1719.

- [141] S. Belák, P. Thoren, N. LeBlanc, G. Viljoen, *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2009**, *9*, 367.
- [142] R. Zeng, H. Q. Ruan, X. S. Jiang, H. Zhou, L. Shi, L. Zhang, Q. H. Sheng, Q. Tu, Q. C. Xia, J. R. Wu, *J. Proteome Res.* **2004**, *3*, 549.
- [143] W. Ying, Y. Hao, Y. Zhang, W. Peng, E. Qin, Y. Cai, K. Wei, J. Wang, G. Chang, W. Sun, S. Dai, X. Li, Y. Zhu, J. Li, S. Wu, L. Guo, J. Dai, P. Wan, T. Chen, C. Du, D. Li, J. Wan, X. Kuai, W. Li, R. Shi, H. Wei, C. Cao, M. Yu, H. Liu, F. Dong, D. Wang, X. Zhang, X. Qian, Q. Zhu, F. He, *Proteomics* **2004**, *4*, 492.
- [144] M. Bartlam, Y. Xu, Z. Rao, *J. Struct. Funct. Genomics* **2007**, *8*, 85.
- [145] K. Radtke, D. Kieneker, A. Wolfstein, K. Michael, W. Steffen, T. Scholz, A. Karger, B. Sodeik, *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1000991.
- [146] D. Munday, E. Emmott, R. Surtees, C. H. Lardeau, W. Wu, W. P. Duprex, B. K. Dove, J. N. Barr, J. A. Hiscox, *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9*, 2438.
- [147] X. S. Jiang, L. Y. Tang, J. Dai, H. Zhou, S. J. Li, Q. C. Xia, J. R. Wu, R. Zeng, *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4*, 902.
- [148] L. Zhang, Z. P. Zhang, X. E. Zhang, F. S. Lin, F. Ge, *J. Virol.* **2010**, *84*, 6050.
- [149] D. J. Vigerust, V. L. Shepherd, *Trends Microbiol.* **2007**, *15*, 211.
- [150] X. Zhu, C. Borchers, R. J. Bienstock, K. B. Tomer, *Biochemistry* **2000**, *39*, 11194.
- [151] S. Liedtke, R. Geyer, H. Geyer, *Glycoconjugate J.* **1997**, *14*, 785.
- [152] E. P. Go, Q. Chang, H. X. Liao, L. L. Sutherland, S. M. Alam, B. F. Haynes, H. Desaire, *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 4231.
- [153] M. Melegari, S. K. Wolf, R. J. Schneider, *J. Virol.* **2005**, *79*, 9810.
- [154] E. V. Gazina, J. E. Fielding, B. Lin, D. A. Anderson, *J. Virol.* **2000**, *74*, 4721.
- [155] H. Kang, J. Yu, G. Jung, *Biochem. J.* **2008**, *416*, 47.
- [156] H. Y. Kang, S. Lee, S. G. Park, J. Yu, Y. Kim, G. Jung, *Biochem. J.* **2006**, *398*, 311.
- [157] A. Masi, R. Cicchi, A. Carloni, F. S. Pavone, A. Arcangeli, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2010**, *674*, 33.
- [158] J. R. Lakowicz, *J. Biochem. Biophys. Methods* **1980**, *2*, 91.
- [159] C. Fu, C. Uetrecht, S. Kang, M. Morais, A. J. Heck, M. R. Walter, P. E. Prevelige, *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9*, 1764.
- [160] I. S. Moreira, P. A. Fernandes, M. J. Ramos, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2007**, *68*, 803.
- [161] R. L. Duda, P. D. Ross, N. Cheng, B. A. Firek, R. W. Hendrix, J. F. Conway, A. C. Steven, *J. Mol. Biol.* **2009**, *391*, 471.
- [162] R. B. Pepinsky, I. A. Papayannopoulos, S. Campbell, V. M. Vogt, *J. Virol.* **1996**, *70*, 3313.
- [163] I. Gertsman, E. A. Komives, J. E. Johnson, *J. Mol. Biol.* **2010**, *397*, 560.
- [164] M. Lopper, T. Compton, *J. Virol.* **2002**, *76*, 6073.
- [165] J. Lanman, T. T. Lam, S. Barnes, M. Sakalian, M. R. Emmett, A. G. Marshall, P. E. Prevelige, Jr., *J. Mol. Biol.* **2003**, *325*, 759.
- [166] J. Lanman, T. T. Lam, M. R. Emmett, A. G. Marshall, M. Sakalian, P. E. Prevelige, Jr., *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 676.
- [167] T. T. Lam, J. K. Lanman, M. R. Emmett, C. L. Hendrickson, A. G. Marshall, P. E. Prevelige, *J. Chromatogr. A* **2002**, *982*, 85.
- [168] V. L. Morton, W. Burkitt, G. O'Connor, N. J. Stonehouse, P. G. Stockley, A. E. Ashcroft, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 13468.
- [169] S. D. Fuerstenau, W. H. Benner, J. J. Thomas, C. Brugidou, B. Bothner, G. Siuzdak, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 559; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 541.
- [170] J. J. Thomas, B. Bothner, J. Traina, W. H. Benner, G. Siuzdak, *Spectrosc. Int. J.* **2004**, *18*, 31.
- [171] C. S. Kaddis, S. H. Lomeli, S. Yin, B. Berhane, M. I. Apostol, V. A. Kickhoefer, L. H. Rome, J. A. Loo, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 1206.
- [172] M. A. Tito, K. Tars, K. Volegard, J. Hajdu, C. V. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3550.
- [173] C. Uetrecht, C. Versluis, N. R. Watts, W. H. Roos, G. J. Wuite, P. T. Wingfield, A. C. Steven, A. J. Heck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 9216.
- [174] C. Uetrecht, C. Versluis, N. R. Watts, P. T. Wingfield, A. C. Steven, A. J. Heck, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6343; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6247.
- [175] C. Uetrecht, N. R. Watts, S. J. Stahl, P. T. Wingfield, A. C. Steven, A. J. Heck, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 13368.
- [176] G. K. Shoemaker, E. van Duijn, S. E. Crawford, C. Uetrecht, M. Baclayon, W. H. Roos, G. J. Wuite, M. K. Estes, B. V. Prasad, A. J. Heck, *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9*, 1742.
- [177] L. J. White, M. E. Hardy, M. K. Estes, *J. Virol.* **1997**, *71*, 8066.
- [178] C. Uetrecht, I. M. Barbu, G. K. Shoemaker, E. van Duijn, A. J. Heck, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 126.
- [179] G. Basnak, V. L. Morton, O. Rolfsson, N. J. Stonehouse, A. E. Ashcroft, P. G. Stockley, *J. Mol. Biol.* **2010**, *395*, 924.
- [180] V. L. Morton, E. C. Dykeman, N. J. Stonehouse, A. E. Ashcroft, R. Twarock, P. G. Stockley, *J. Mol. Biol.* **2010**, *401*, 298.
- [181] T. W. Knapman, V. L. Morton, N. J. Stonehouse, P. G. Stockley, A. E. Ashcroft, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 3033.
- [182] L. O. Liepold, J. Revis, M. Allen, L. Oltrogge, M. Young, T. Douglas, *Phys. Biol.* **2005**, *2*, S166.
- [183] M. J. Abedin, L. Liepold, P. Suci, M. Young, T. Douglas, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4346.
- [184] S. Kang, L. M. Oltrogge, C. C. Broomell, L. O. Liepold, P. E. Prevelige, M. Young, T. Douglas, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16527.
- [185] S. Kang, C. C. Jolley, L. O. Liepold, M. Young, T. Douglas, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4866; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4772.
- [186] M. Sharon, S. Witt, E. Glasmacher, W. Baumeister, C. V. Robinson, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 18448.
- [187] J. A. Loo, B. Berhane, C. S. Kaddis, K. M. Wooding, Y. Xie, S. L. Kaufman, I. V. Chernushevich, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 998.
- [188] F. Alber, S. Dokudovskaya, L. M. Veenhoff, W. Zhang, J. Kipper, D. Devos, A. Suprpto, O. Karni-Schmidt, R. Williams, B. T. Chait, A. Sali, M. P. Rout, *Nature* **2007**, *450*, 695.
- [189] J. L. Benesch, B. T. Ruotolo, D. A. Simmons, N. P. Barrera, N. Morgner, L. Wang, H. R. Saibil, C. V. Robinson, *J. Struct. Biol.* **2010**, *172*, 161.
- [190] S. Nickell, C. Kofler, A. P. Leis, W. Baumeister, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 225.
- [191] R. Neutze, R. Wouts, D. van der Spoel, E. Weckert, J. Hajdu, *Nature* **2000**, *406*, 752.
- [192] K. Lorenzen, A. S. Olia, C. Uetrecht, G. Cingolani, A. J. Heck, *J. Mol. Biol.* **2008**, *379*, 385.