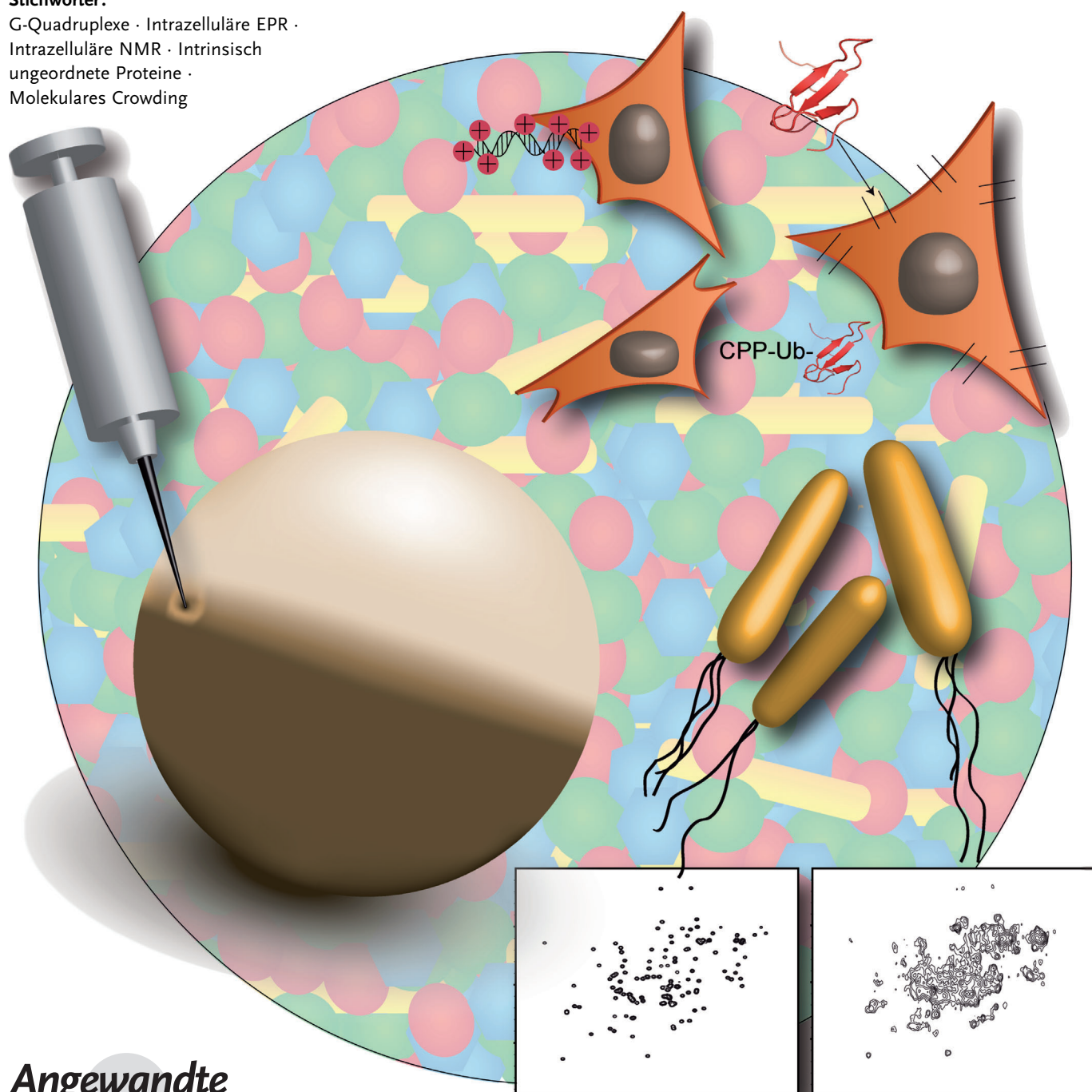


Intrazelluläre NMR- und EPR-Spektroskopie von biologischen Makromolekülen

Robert Hänsel, Laura M. Luh, Ivan Corbeski, Lukáš Trantírek und Volker Dötsch*

Stichwörter:

G-Quadruplexe · Intrazelluläre EPR ·
Intrazelluläre NMR · Intrinsisch
ungeordnete Proteine ·
Molekulares Crowding



Der Traum eines Zellbiologen ist es, biologischen Makromolekülen bei ihrer Arbeit im Inneren von lebenden Zellen zusehen zu können. Dies würde bedeuten, sowohl den Ort als auch die Konformation dieser Makromoleküle mit biophysikalischen Methoden zu beobachten. Die Entwicklung von Fluoreszenztechniken, vor allem von Hochauflösungsfluoreszenzmikroskopiemethoden, hat unsere Möglichkeiten zur Lokalisierung von Proteinen und anderen Molekülen im Inneren von Zellen erheblich erweitert. Die Struktur von Makromolekülen und ihre Konformationsänderungen in lebenden Zellen zu bestimmen, ist hingegen noch immer eine große Herausforderung. Im Prinzip können NMR- und EPR-Spektroskopie diese Informationen liefern. Die Entwicklung von intrazellulären Magnetresonanzmethoden hat die Anwendbarkeit dieser Methoden demonstriert. In diesem Aufsatz geben wir einen Überblick über die relevanten Techniken mit einem Fokus auf die intrazelluläre Flüssig-NMR-Spektroskopie, beschreiben ihre Anwendungen und diskutieren die Herausforderungen für die Zukunft.

1. Einleitung

Das Innere von Zellen ist gefüllt mit Makromolekülen, die sich in Größe, Lokalisation, Aktivität und der Fähigkeit zur Wechselwirkung mit anderen Komponenten unterscheiden. Ein detailliertes Verständnis der biologischen Funktion von Makromolekülen wie Proteinen, DNA oder RNA und ihrer Komplexe bedarf der Kenntnis ihrer dreidimensionalen Struktur. NMR-Spektroskopie und Röntgenstrukturanalyse sind die am häufigsten verwendeten Methoden, um Strukturen mit atomarer Auflösung zu bestimmen. Allerdings werden diese Techniken unter In-vitro-Bedingungen angewendet, die für die beste spektrale Auflösung bzw. besten Bedingungen für das Wachsen von Kristallen optimiert sind. Diese Optimierung vernachlässigt jedoch den Einfluss zellulärer Faktoren wie z. B. Viskosität, „molekulares Crowding“, Aktivität des Wassers und die Wechselwirkung mit anderen Makromolekülen oder Ionen und zellulären Metaboliten auf die Konformation und Dynamik des zu untersuchenden Makromoleküls.^[1–5]

Basierend auf der Nicht-Invasivität der NMR-Spektroskopie und der Entwicklung von In-vivo-NMR-Methoden wurde das Feld der intrazellulären NMR-Spektroskopie seit 2001 entwickelt. Erste Untersuchungsobjekte waren isotonenmarkierte kleine Proteine und periplasmatische Glucane in lebenden Bakterienzellen.^[6–8] Seit dieser Zeit ist die Methode auf eine Reihe anderer zellulärer Systeme erweitert worden, einschließlich der Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* und Säugerzellen.^[9–13] Die Möglichkeit, mittels NMR-Spektroskopie Änderungen in der Konformation von Makromolekülen zwischen ihrem Zustand unter In-vitro-Bedingungen und in lebenden Zellen zu detektieren, basiert auf der Sensitivität der chemischen Verschiebung gegenüber der Umgebung eines Kerns. Änderungen in der Konformation, aber auch die Bindung anderer Moleküle oder posttranslationale Modifikationen führen zu solchen Verände-

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	10467
2. Technische Aspekte der intrazellulären NMR- und PELDOR-EPR-Spektroskopie	10468
3. Zelluläre NMR- und EPR-Systeme und ihre Anwendungen	10472
4. Perspektiven der intrazellulären NMR-Spektroskopie	10478

rungen und können über die Verschiebung von Resonanzpositionen in ein- oder zweidimensionalen NMR-Spektren detektiert werden. Eine der Limitierungen der intrazellulären NMR-Spektroskopie ist die generell niedrige Empfindlichkeit der NMR-

Spektroskopie und die damit verbundene notwendige hohe intrazelluläre Konzentration (50–250 μM) der zu untersuchenden Makromoleküle. Diese Konzentrationen sind typischerweise um einige Größenordnungen höher als die natürlichen Konzentrationen (0.5–1 μM). Aus diesem Grunde wird intrazelluläre NMR-Spektroskopie meistens nicht für die Untersuchung spezifischer Wechselwirkungen zwischen einem Makromolekül und zellulären Komponenten verwendet, sondern um enzymatische oder nicht-spezifische Interaktionen zu charakterisieren. Enzymatische Wechselwirkungen beinhalten alle Arten posttranslationaler Modifikationen einschließlich proteolytischem Abbau. Für diesen Typ der Wechselwirkung ist eine viel geringere Konzentration der beteiligten Enzyme relativ zur Konzentration der zu untersuchenden Makromoleküle erforderlich, wodurch enzymatische Wechselwirkungen mittels intrazellulärer NMR-Spektroskopie untersucht werden können. Nicht-spezifische Wechselwirkungen sind z. B. Effekte des sogenannten „molekularen Crowdings“ auf die Konformation eines Makromoleküls. So wird z. B. für intrinsisch nicht-gefaltete Proteine angenommen, dass „molekulares Crowding“ zu einer kompakteren Konformation als in verdünnten Lösungen führt.^[14,15] Da die zelluläre Gesamtkonzentration aller Proteine 400 g L^{-1} erreicht, hat ein Makromolekül in einer Zelle viel weniger Platz als in einer verdünnten Lösung wie sie typischerweise für In-vitro-Untersuchungen verwendet wird.^[1]

[*] R. Hänsel, L. M. Luh, I. Corbeski, Prof. V. Dötsch
Institut für Biophysikalische Chemie und Center for Biomolecular
Magnetic Resonance, Goethe-Universität Frankfurt
Max-von-Laue-Straße 9, 60438 Frankfurt (Deutschland)
E-Mail: v.doetsch@em.uni-frankfurt.de
L. Trantirek
Central European Institute of Technology, Masaryk University
Kamenice 5, 625 00 Brno (Tschechische Republik)

Intrazellulärer NMR-Experimente mit mehreren kleinen Proteinen, die in zahlreichen In-vitro-NMR-Untersuchungen verwendet wurden, haben zudem gezeigt, dass viele dieser Proteine nicht-spezifisch durch schwache, anziehende Wechselwirkungen mit anderen zellulären Komponenten interagieren.^[16–20] Dies führt häufig zum Verlust der NMR-Signale. Diese experimentellen Schwierigkeiten können z. B. durch das Markieren und Detektieren von Methylgruppen in Proteinen überwunden werden, da diese eine größere Sensitivität als andere Gruppen aufweisen.^[21] Außerdem wurden Protokolle für die Untersuchung von Makromolekülen mittels intrazellulärer Festkörper-NMR-Spektroskopie und intrazellulärer EPR-Spektroskopie entwickelt.^[22–24] Sowohl intrazelluläre Festkörper-NMR-Spektroskopie als auch intrazelluläre EPR-Spektroskopie werden typischerweise bei niedrigen Temperaturen durchgeführt, und die Detektion wird nicht durch die Größe der Makromoleküle oder ihrer Komplexe beeinflusst. Das Besondere an intrazellulärer EPR-Spektroskopie ist, dass mithilfe des PELDOR-Experiments (pulsed

electron double resonance; auch DEER, double electron-electron resonance) Distanzen innerhalb eines Makromoleküls gemessen und so globale Konformationsänderungen untersucht werden können.^[25–27]

In diesem Aufsatz beschreiben wir allgemeine technische Aspekte der intrazellulären NMR- und EPR-Spektroskopie (Abschnitt 2). Wir diskutieren alle bisher verwendeten Zelltypen bezüglich ihrer Anwendbarkeit, notwendiger Kontrollexperimente und Einschränkungen (Abschnitt 3). Schließlich diskutieren wir wichtige Beiträge und zukünftige Herausforderungen der intrazellulären NMR- und EPR-Spektroskopie (Abschnitt 4).

2. Technische Aspekte der intrazellulären NMR- und PELDOR-EPR-Spektroskopie

2.1. Technische Grundlagen

Die Beobachtung eines bestimmten Makromoleküls im zellulären Kontext setzt voraus, dass dieses Makromolekül markiert ist: im Falle der intrazellulären NMR-Spektroskopie mit NMR-aktiven Isotopen und im Falle der intrazellulären EPR-Spektroskopie mit paramagnetischen Spinsonden. Für intrazelluläre NMR-Spektroskopie hat sich die Markierung mit den Isotopen ^{13}C (1.1 % natürliche Häufigkeit) und ^{15}N (0.36 % natürliche Häufigkeit) als sinnvoll herausgestellt, um die zellulären Hintergrundsignale aller Protonen herauszufiltern und Informationen über das zu untersuchende Makromolekül im Zellinneren zu erhalten. Mithilfe von Experimenten wie 2D- ^{15}N , ^1H -HSQC und 2D- ^{13}C , ^1H -HSQC,



Ivan Corbeski wurde 1986 in Skopje, Mazedonien, geboren. Er studierte Biochemie an der Goethe-Universität Frankfurt und schloss sich 2011 der Arbeitsgruppe von Volker Dötsch am Institut für Biophysikalische Chemie an, wo er über intrazelluläre NMR-Spektroskopie forscht und 2014 sein Diplom erhalten wird. Sein Schwerpunkt ist die NMR-spektroskopische Untersuchung der Strukturen, Dynamiken und Mechanismen von Biomolekülen unter Crowding-Bedingungen und in zellulärer Umgebung.



Laura Luh wurde 1983 in Gießen geboren. Sie erhielt 2008 ihr Diplom in Biochemie an der Goethe-Universität Frankfurt und promovierte 2014 an gleicher Stelle bei Volker Dötsch. Ihr Forschungsschwerpunkt ist die Untersuchung der Funktion und Regulation von p53-Proteinen sowie deren Wechselwirkung mit Bindungspartnern mit zellbiologischen und biophysikalischen Methoden.



Lukas Trantirek wurde 1975 in Mährisch Trübau, Tschechien, geboren. Er erhielt 1998 seinen M.Sc. in organischer Chemie an der Masaryk University in Brno und promovierte 2001 an gleicher Stelle bei Prof. Vladimír Sklenář. Er war EMBO-Postdoktorand bei Juli Feigon an der University of California Los Angeles (2002–2003), wechselte danach als unabhängiger Forscher an die University of Utrecht und schloss sich schließlich dem Central European Institute of Technology der Masaryk University an. Seine Schwerpunkte sind die Strukturbiochemie von Nukleinsäuren und die NMR-Spektroskopie.



Robert Hänsel-Hertsch wurde 1982 in Berlin geboren. Er erhielt 2009 sein Diplom in Biochemie an der Goethe-Universität Frankfurt bei Volker Dötsch und promovierte 2013 an gleicher Stelle über NMR-Untersuchungen des strukturellen Verhaltens von telomerer DNA in lebenden Zellen. Zurzeit ist er EMBO-Postdoktorand bei Shankar Balasubramanian am Cancer Research UK in Cambridge, wo er mithilfe neuartiger Sequenzierungstechniken die G-Quadruplex-DNA und deren Rolle in der Krebsentwicklung erforscht.



Volker Dötsch wurde 1967 in Frankfurt geboren. Er erhielt 1990 sein Diplom in Chemie an der Universität Göttingen bei Thomas Jovin und promovierte 1994 an der ETH Zürich bei Kurt Wüthrich. Er war EMBO-Postdoktorand bei Gerhard Wagner an der Harvard Medical School, Boston (1994–1998), und begann 1998 seine unabhängige Laufbahn an der UCSF in San Francisco mit Schwerpunkt auf der Entwicklung der intrazellulären NMR-Spektroskopie. 2003 wurde er Professor an der Goethe-Universität Frankfurt, wo er sich mit der Untersuchung der Struktur und Funktion von biologischen Makromolekülen mit NMR- und anderen Techniken befasst.

die nur solche Protonen selektieren, die direkt an ^{15}N - oder ^{13}C -Kerne gekoppelt sind und alle anderen Protonensignale unterdrücken, können die NMR-Signale des markierten Makromoleküls selektiv detektiert werden. Vor allem 2D- ^{15}N , ^1H -HSQC, das die chemischen Verschiebungen der Amidprotonen und Stickstoffkerne misst, wird verwendet, um Informationen über die Konformation des Proteinrückgrats zu erhalten. Das Markieren von biologischen Makromolekülen kann durch Überexpression erfolgen (entweder in den für die intrazellulären NMR-Experimente verwendeten Zellen oder in anderen Zellen), oder durch chemische Synthese mit anschließender Reinigung und Mikroinjektion oder Transfektion in ein geeignetes zelluläres System (Abbildung 1). Im Falle, dass die markierten Makromoleküle mikroinjiziert oder transfiziert werden, trägt nur die natürliche ^{15}N - bzw. ^{13}C -Häufigkeit zum zellulären Hintergrundsignal bei. Im Falle der zellulären Überexpression in den Zellen, die auch für die Experimente verwendet werden, wird nicht nur das zu untersuchende Makromolekül markiert, sondern auch alle anderen zellulären Komponenten. Ursprünglich hatten wir ein kompliziertes Verfahren zur Herstellung von intrazellulären NMR-Proben vorgeschlagen, das beinhaltete, die Bakterien zuerst auf nicht-markiertem Medium wachsen zu lassen und sie nur für die Zeit der Expressionsinduktion in markiertes Medium zu transferieren. Zusätzlich hatten wir Rifampicin dem Medium zugesetzt, wodurch die bakterielle, aber nicht die T7-RNA-Polymerase inhibiert^[7] und so die selektive Überexpression des zu untersuchenden Proteins ermöglicht wird. Allerdings stellte sich heraus, dass im Falle von ^{15}N -Markierung praktisch kein zellulärer Hintergrund zu sehen ist, auch wenn die Bakterien von Anfang an in einem ^{15}N -markierten Medium wuchsen und die Proteinüberexpression ohne die Zugabe von Rifampicin initiiert wurde (Abbildung 2). Die einzige Bedingung für die Beobachtung des zu untersuchenden Proteins ist, dass es frei rotieren kann (siehe unten) und seine zelluläre Konzentration einen bestimmten Mindestwert erreicht (ca. 5 % der gesamten löslichen Proteinmenge einer Zelle). Die überraschende Abwesenheit eines nennenswerten Hintergrundsignals kommt durch die geringe Anzahl von Stickstoff-gebundenen Protonen in biologischen Molekülen und den schnellen Austausch vieler dieser Protonen mit dem Wasser zustande, wodurch ihre Signale verschwinden.^[7] Im Gegensatz dazu gibt es erheblich mehr Kohlenstoff-gebundene Protonen, die zudem nicht mit dem Wasser austauschen, was zu einem signifikanten Maß an Hintergrundsignalen für Proben führt, die durch Überexpression in ^{13}C -Glucose-haltigen Medien erzeugt wurden (Abbildung 3A).^[21] Dieses Problem kann jedoch umgangen werden, z.B. mittels selektiver Markierungen (Abbildung 3B). Als Alternative wurde gezeigt, dass Experimente mit Kohärenztransferschritten von ^{15}N -Kernen zu ^{13}C -Kernen in Kombination mit direkter ^{13}C -Detektion intrazelluläre NMR-Spektren mit hervorragender Qualität erzeugen können.^[28]

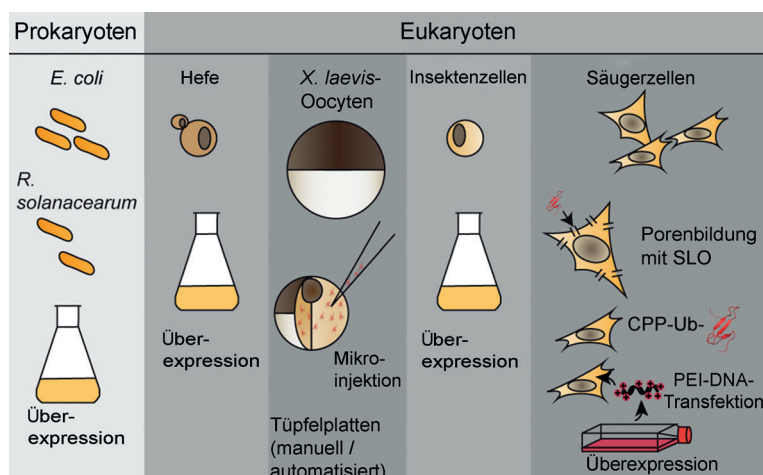


Abbildung 1. Etablierte Methoden zur Herstellung von intrazellulären NMR- und EPR-Proben in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen. Intrazelluläre NMR-Experimente in Bakterien-, Hefe- und Insektenzellen basieren auf der Überexpression des zu untersuchenden Proteins. Hingegen werden zur Probenherstellung mit *Xenopus laevis*-Oocyten Makromoleküle injiziert. Die Erweiterung der intrazellulären NMR-Methoden auf Säugerzellen resultierte in einer Vielzahl von Verfahren, einschließlich der Bildung von Poren mittels Streptolysin-O (SLO), der Verwendung membrandurchlässiger Peptide (CPP) und der Überexpression in Kombination mit Polyethylenimin-vermittelter Plasmidtransfektion.

Für intrazelluläre Flüssig-NMR-Experimente muss eine zweite Bedingung erfüllt sein: Die zu untersuchenden Moleküle müssen sich ausreichend schnell in der zellulären Umgebung drehen können. Mehrere Untersuchungen haben ergeben, dass die intrazelluläre Rotationskorrelationszeit in den meisten Zelltypen nur um einen Faktor 2–3 langsamer ist als in einer wässrigen Lösung. Daraus ergibt sich ein um denselben Faktor erhöhtes „scheinbares“ Molekulargewicht.^[7,29,30] Wechselwirkungen mit anderen großen zellulären Komponenten wie z.B. anderen Makromolekülen, Komplexen oder Membranen verlangsamen die Rotation aller-

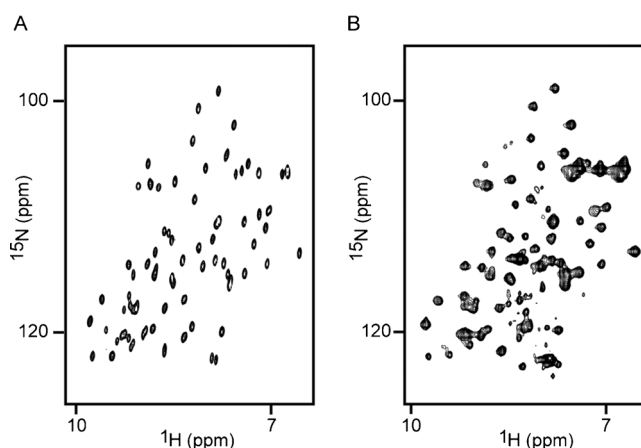


Abbildung 2. Vergleich eines ^{15}N , ^1H -HSQC-Spektrums der gereinigten N-terminalen Domäne der bakteriellen Quecksilberionen-Reduktase MerA (NmerA) (A) mit einem entsprechenden intrazellulären NMR-Spektrum in lebenden *E. coli*-Zellen (B). Das Signalmuster ist in beiden Spektren sehr ähnlich, die Linienbreite in dem intrazellulären NMR-Spektrum ist jedoch deutlich größer.

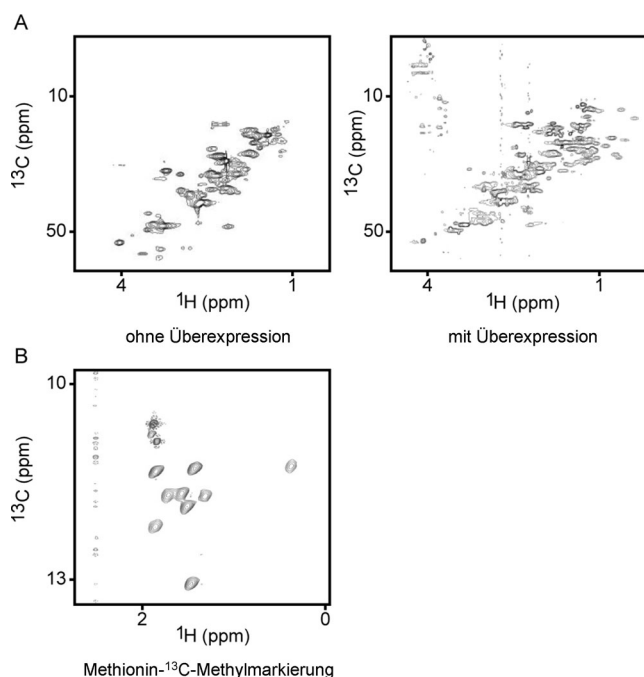


Abbildung 3. Der Level an Hintergrundsignalen ist in intrazellulären [^{13}C , ^1H]-HSQC-Spektren signifikant höher als in intrazellulären [^{15}N , ^1H]-HSQC-Spektren. Die beiden Spektren in (A) wurden mit *E. coli*-Bakterien aufgenommen, die entweder nicht induziert waren (links) oder Calmodulin überexprimierten (rechts). Nur die Signale hochfeldverschobener Methylgruppen können eindeutig dem Calmodulin zugeordnet werden. Hintergrundsignale können durch selektive Markierung weitgehend unterdrückt werden. Das Spektrum in (B) zeigt ein intrazelluläres [^{13}C , ^1H]-HSQC-Spektrum von Calmodulin, das selektiv mit ^{13}C -methylmarkiertem Methionin markiert ist.

dings zusätzlich, was zu sehr breiten Resonanzlinien oder auch dem vollständigen Verlust der Signale führen kann.^[16,17] Intrinsisch nicht-gefaltete Proteine hingegen zeigen häufig weniger Wechselwirkung mit ihrer Umgebung und können zudem die Verlangsamung ihrer Rotation mit ihrer hohen internen Flexibilität kompensieren. Daher sind intrazelluläre NMR-Experimente mit zahlreichen nicht-gefalteten Proteinen durchgeführt worden.^[14,31–33] Demgegenüber sind die Resonanzen vieler gefalteter Proteine nicht detektierbar, was zeigt, dass ihre Rotation in vivo deutlich langsamer ist, wahrscheinlich verursacht durch schwache, nicht-spezifische Wechselwirkungen mit anderen zellulären Komponenten.^[16–18,20,34] In diesen Fällen kann man versuchen, die Methylgruppen dieser Proteine zu detektieren, da diese durch ihre schnelle interne Rotation besser detektierbar sind.^[21] ^{13}C -Markierung spezifischer Methylgruppen hat den zusätzlichen Vorteil, dass Probleme mit der Überlappung von Signalen sowie das Problem des hohen zellulären Hintergrundsignals überwunden werden können (Abbildung 3). Besonders nützlich sind die Methylgruppen von Methioninen und die δ -Methylgruppen von Isoleucinen, die sehr langsam relaxieren.^[35] Zusätzlich zu spezifischen ^{13}C -Markierungen hat sich die Markierung mit dem Isotop ^{19}F , z.B. über Tryptophan-, Phenylalanin- oder Tyrosin-Analoga, als nützlich für die Charakterisierung von ungefalteten und schwierigen Proteinen herausgestellt. Zusätzlich zu seiner hohen Sensitivität –

das gyromagnetische Verhältnis ist ähnlich dem des Protons, und 1D-Experimente sind empfindlicher als mehrdimensionale Experimente – ist der Vorteil des ^{19}F Isotops gegenüber ^{13}C die Abwesenheit jeglichen Hintergrundsignals in Zellen.^[30,36] Falls sogar Methylgruppen mit ihrer schnellen Rotation nicht mehr in intrazellulären Flüssig-NMR-Experimenten zu detektieren sind, können intrazelluläre Festkörper-NMR-Methoden angewendet werden, die erst kürzlich sowohl für Experimente mit löslichen Proteinen wie auch mit Membranproteinen etabliert wurden.^[22,37,38]

Neben der schwachen, nicht-spezifischen Wechselwirkung mit anderen zellulären Komponenten kann der Verlust der NMR-Signale in intrazellulären NMR-Experimenten auch durch die Bildung großer spezifischer Komplexe, Abbau oder konformationellen Austausch verursacht werden. Die Bildung spezifischer Komplexe ist in den meisten Fällen unwahrscheinlich, da die geringe Empfindlichkeit der NMR-Spektroskopie eine hohe zelluläre Konzentration der zu untersuchenden Makromoleküle voraussetzt, die typischerweise mehrere Größenordnungen höher ist als die Konzentration eines spezifischen Bindungspartners. Der Abbau von Makromolekülen ist bisher hauptsächlich in intrazellulären NMR-Experimenten mit Nukleinsäuren beobachtet worden.^[39,40] Signalverlust kann auch durch den Austausch zwischen verschiedenen Konformationen des Makromoleküls hervorgerufen werden. Dieser Fall ist an einem nicht-gefalteten Protein in Bakterien beobachtet worden.^[15] Während das In-vitro-Spektrum des Proteins FlgM die typische geringe Dispersion der chemischen Verschiebung und scharfe Resonanzsignale eines nicht-gefalteten Proteins zeigt, ist das intrazelluläre Spektrum durch breite und fehlende Signale charakterisiert. Dieser Signalverlust im [^{15}N , ^1H]-HSQC-Spektrum wurde mit dem Austausch zwischen verschiedenen Konformationen innerhalb eines „Molten-Globule“-Zustands erklärt, der durch die zelluläre Umgebung induziert wurde.

Sobald Bedingungen gefunden sind, die das Detektieren von intrazellulären [^{15}N , ^1H]- oder [^{13}C , ^1H]-HSQC-NMR-Spektren ermöglichen, können die Resonanzpositionen in diesen Spektren mit denen verglichen werden, die in verdünnter Lösung mit gereinigten Molekülen in vitro aufgenommen wurden. Änderungen in den chemischen Verschiebungen zwischen den In-vitro- und intrazellulären NMR-Spektren deuten auf Differenzen in der Konformation, Bindungen anderer Moleküle oder posttranslationale Modifikationen hin. Falls die Zuordnungen der Resonanzen oder gar die Struktur bekannt sind, kann die Bindungsstelle bzw. Stelle der posttranslationalen Modifizierung identifiziert werden. Sollte starke Überlappung der Signale eine eindeutige Interpretation der Spektren unmöglich machen, können ^{15}N -Markierungen einzelner Aminosäuretypen verwendet werden, um die Komplexität der Spektren zu reduzieren.^[7]

2.2. Dynamik

Zahlreiche Studien haben in der Vergangenheit die Bedeutung der Dynamik von Proteinen für ihre spezifische Funktion belegt (siehe Lit. [41–44]). Diese Studien machten

sich die einzigartigen Möglichkeiten der NMR-Spektroskopie zu Nutze, Dynamiken vom Pikosekunden- bis zum Sekundenbereich mit atomarer Auflösung zu untersuchen.^[45] Die Untersuchung der Proteindynamik in Zellen oder zellulären Extrakten stellte sich jedoch als technisch schwierig heraus, und nur wenige Studien sind bisher publiziert. Der Hauptgrund ist die begrenzte Lebensdauer von Zellen in einem NMR-Röhrchen bzw. die begrenzte Zeit, die Zellen während der NMR-Messung in einem definierten metabolischen Zustand gehalten werden können. Diese Zeit ist oftmals zu kurz für die Relaxationsexperimente, die lange Messzeiten benötigen. Weiterhin wird die Beweglichkeit der Proteine durch das zelluläre Milieu durch schwache, anziehende Wechselwirkungen verändert, die zu einer Verlangsamung der Bewegung führen. Das wiederum führt zu einer langsameren longitudinalen und einer schnelleren transversalen Relaxation, was seinerseits Signalverbreiterungen und eine geringere Empfindlichkeit zur Folge hat. Daher haben nur wenige Proteine bisher die Qualität der intrazellulären NMR-Spektren erreicht, die für eine Untersuchung ihrer Dynamik in einer zellulären Umgebung notwendig wäre. Von besonderem Interesse sind Untersuchungen konformationeller Austauschprozesse, die mittels Relaxations-Dispersions-Experimenten charakterisiert werden können. Diese Experimente liefern nicht nur kinetische Informationen über die Geschwindigkeit des Austauschs, sie können auch strukturelle Informationen über nicht direkt detektierbare Konformationen liefern.^[46–48] Latham und Kay haben kürzlich die Anwendbarkeit dieser Methode in *E. coli*-Lysaten demonstriert.^[35]

Falls die Austauschkinetik zwischen den Konformationen noch langsamer ist, können Austauschexperimente (EXSY), die auf dem Austausch von α -Magnetisierung beruhen, angewendet werden.^[49] Die Anwendbarkeit dieser Methode wird durch die longitudinale Relaxationsgeschwindigkeit bestimmt, sodass längere T_1 -Zeiten, wie sie in intrazellulären NMR-Experimenten vorkommen, von Vorteil sind. Allerdings kann Überlappung der Resonanzsignale sowie eine geringe Empfindlichkeit die Interpretation der Spektren erschweren. Spezifische Markierungen können verwendet werden, um das Problem zu umgehen. In einer intrazellulären Studie von Takaoka et al. wurden EXSY-Spektren mit ^{19}F -markierter menschlicher Carboanhydrase I (hCAI) in roten Blutzellen gemessen.^[50] Dadurch konnte erstmals die Bindungskinetik und Thermodynamik eines Enzyms und seines Inhibitors mit intrazellulären NMR-Methoden gemessen werden.

Konformationeller Austausch und Proteinstabilität können schließlich auch durch Messung der Protonen/Deuteronen-Austauschgeschwindigkeit der Amidprotonen untersucht werden. Um die Stabilität von Ubiquitin im zellulären Milieu zu untersuchen, haben Inomata et al. die Austauschgeschwindigkeit der Amidprotonen in menschlichen Zellen bestimmt.^[11] Dazu haben sie ^{15}N -markiertes Ubiquitin mittels Guanidiniumhydrochlorid in D_2O bei pH 7.3 entfaltet, anschließend rasch gefaltet und in eine Lösung mit H_2O dialysiert. Nur sehr gut geschützte Amidgruppen bleiben dabei deuteriert.^[51] Diese geschützten Amidgruppen tauschen ihre Deuteronen gegen Protonen im Falle einer Pro-

teinfaltung aus und können so zur Untersuchung der Proteinstabilität herangezogen werden. Partiiell deuteriertes Ubiquitin wurde in HeLa-Zellen transferiert. Um den Deuterierungsgrad zu analysieren, wurden Zellen nach verschiedenen Zeitintervallen bei pH 5 lysiert, und ^{15}N , ^1H -HSQC-Spektren der verschiedenen Lysate wurden gemessen. Die Austauschkinetik wurde durch Integration der Resonanzsignale über die Zeit erhalten, und die intrazellulären Daten wurden mit Referenzdaten verglichen, die aus In-vitro-Experimenten erhalten wurden.^[11]

2.3. Nukleinsäuren

Anders als intrazelluläre NMR-Experimente mit Proteinen basieren entsprechende Experimente mit Nukleinsäuren bisher ausschließlich auf der Injektion der Makromoleküle in *Xenopus laevis*-Oozyten (Abbildung 4).^[39] Während die Detektion von Resonanzsignalen von Proteinen deren Isotopenmarkierung erfordert, können die Iminoprotonen von Nukleinsäuren mittels einfacher 1D- ^1H -Detektion ohne kostspielige Isotopenmarkierung beobachtet werden. Dies liegt daran, dass im Bereich zwischen 11 und 15 ppm keinerlei Hintergrundsignale zu sehen sind. Iminoprotonen von zellu-

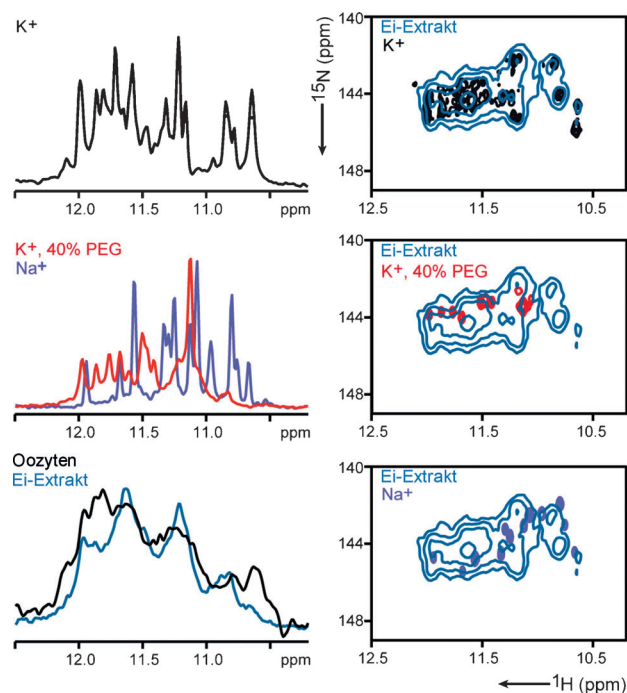


Abbildung 4. $d(\text{AG}_3(\text{TTAGGG})_3)$ liegt in Zellen in G-Quadruplex-Konformationen vor, die nur in verdünnten, K^+ -haltigen Lösungen beobachtet werden. Links: Überlagerung von ^{15}N -selektierten 1D-Iminprotonenspektren des $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -markierten $d(\text{AG}_3(\text{TTAGGG})_3)$ -Quadruplex, gemessen in verdünnter K^+ -Lösung (oben), in verdünnter Na^+ -Lösung und K^+ -Lösung mit 40% PEG200 (Mitte) sowie in Ei-Extrakt aus *Xenopus laevis* und in *Xenopus laevis*-Oozyten (unten). Rechts: Vergleich der 2D- ^{15}N , ^1H -sfHMQC-Spektren des Iminprotonenbereichs des $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -markierten $d(\text{AG}_3(\text{TTAGGG})_3)$ -Quadruplex in Ei-Extrakt aus *Xenopus laevis* mit Spektren, die in verdünnter K^+ -Lösung, in K^+ -Lösung mit 40% PEG200 und in Na^+ -Lösung erhalten wurden.

lären Nukleinsäuren werden nicht detektiert, da die meisten natürlich vorkommenden Nukleinsäuren zu groß sind und ihre Konzentration zu gering ist, während die Signale von Iminoprotomen freier Nukleotide durch den schnellen Austausch mit Wasser unterdrückt werden. Dies ermöglicht die Untersuchung von injizierten kleinen und mittelgroßen RNA- und DNA-Molekülen mit in Sekundärstrukturelementen geschützten Iminoprotomen mittels intrazellulärer NMR-Spektroskopie. Mithilfe der Iminoprotomen lassen sich lokale und globale Faltungstopologien und deren Änderungen über 1D- ^1H -NMR-Experimente untersuchen.^[52] Trotz der schlechten Auflösung ermöglicht ein Vergleich der intrazellulären und der In-vitro-Spektren ein Erkennen struktureller Änderungen.^[39,40,52] Solche intrazellulären NMR-Experimente haben jedoch auch gezeigt, dass DNA- und RNA-Schleifenstrukturen empfindlich gegenüber Abbau durch endogene Nukleasen sind, wodurch die Experimentierzeit eingeschränkt wird.^[39] Dieser Abbau kann jedoch erfolgreich durch chemische Modifikationen wie den Ersatz einer Phosphatgruppe im Rückgrat durch eine Thiophosphatgruppe oder Methylierung der O2'-Hydroxygruppe unterdrückt werden.^[39] Zusätzlich zu der Stabilisierung von RNA- und DNA-Molekülen hat die Thiophosphat-Modifizierung den Vorteil, dass Nukleinsäuren mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie in Zellen detektiert werden können, da die Thiophosphatgruppe eine sehr charakteristische chemische Verschiebung (ca. 54 ppm) aufweist und sich so von allen anderen Phosphatgruppen unterscheidet.^[39] Detailliertere Studien von Nukleinsäuren mit intrazellulären 2D-NMR-Experimenten mit Iminoprotomen, aromatischen Protonen oder den Zuckersignalen benötigen ^{15}N - oder ^{13}C -Markierungen. Durch den Abbau kann die Interpretation der Spektren im aromatischen Bereich und im Zuckerbereich schwieriger sein, da Signale sowohl von den intakten Molekülen als auch von den Abbauprodukten stammen könnten. Da Nukleinsäuren auch chemisch synthetisiert werden können, können Isotopenmarkierungen auch sehr selektiv in bestimmten Positionen angebracht werden. Dies kann 1D- und auch 2D-Spektren erheblich vereinfachen. Zum Beispiel kann eine spezifische Markierung einer einzelnen Base in einer Nukleinsäuresequenz sehr einfach zeigen, ob ein bestimmtes Molekül in einer oder in mehreren Konformationen vorliegt.^[53] Zusätzlich zu den Iminoprotomen können auch aromatische und Zuckerprotonen als Markierungssonden in [^1H - ^{13}C]-ct-TROSY-HSQC-Experimenten verwendet werden. Signale in diesen spektralen Regionen haben unterschiedliche Vorzeichen, abhängig von der Anzahl der direkt gebundenen ^{13}C -Kerne.^[54]

2.4. Intrazelluläre EPR-Spektroskopie

Während NMR-Spektroskopie die magnetischen Eigenschaften der Kernspins heranzieht, basiert EPR-Spektroskopie auf dem magnetischen Moment ungepaarter Elektronen. Einer der Vorteile der EPR-Spektroskopie ist ihre im Vergleich zur NMR-Spektroskopie höhere Empfindlichkeit. Von besonderem Interesse ist dabei eine als PELDOR (oder DEER) bezeichnete Technik, die die dipolare Kopplung

zwischen ungepaarten Elektronen misst, die 1.5 bis 10 nm voneinander entfernt sind.^[25,27,55] Die Bausteine der Proteine und der Nukleinsäuren enthalten keinerlei paramagnetische Zentren, was dazu führt, dass EPR-Messungen das Markieren von Makromolekülen mit stabilen Spinsonden voraussetzt. Typischerweise werden dabei Nitroxid enthaltende Spinsonden wie 3-Maleimidoproxyl (5-MSL) oder 2,2,5,5-Tetramethyl-1-oxyl-3-methylmethanthiosulfonat (MTSL) kovalent an Cysteine in Proteinen gebunden.^[56,57] Nukleinsäuren hingegen werden entweder an der Base, am Zucker oder am Phosphatrückgrat während oder nach der chemischen Synthese markiert.^[58] Kürzlich wurde zudem gezeigt, dass Spinsonden-markierte Proteine, die nicht-natürliche Aminosäuren mit einem paramagnetischen Zentrum enthalten, sich über die Methode der Amber-Codon-Umwandlung durch intrazelluläre Expression herstellen lassen.^[59,60]

Im Unterschied zu intrazellulären Flüssig-NMR-Experimenten, die bei physiologischen Temperaturen durchgeführt werden, werden PELDOR-EPR-Spektren meist bei sehr tiefen Temperaturen (50 K) gemessen, da die schnelle Relaxation der Nitroxid-Spinsonden die Messung bei höheren Temperaturen verhindert. Die Verwendung neuer Spinsonden mit besseren Relaxationseigenschaften könnte in der Zukunft PELDOR-Messungen bei physiologischen Temperaturen möglich machen.^[61] Obwohl EPR-Spektroskopie empfindlicher ist als NMR-Spektroskopie benötigen beide Methoden sehr hohe Konzentrationen der Makromoleküle (50–250 μM), um die notwendige Empfindlichkeit zu erreichen (Tabelle 1).^[23,62–64]

3. Zelluläre NMR- und EPR-Systeme und ihre Anwendungen

3.1. *Escherichia coli*

Seit den ersten intrazellulären NMR-Experimenten im Jahr 2001^[6] ist das Bakterium *E. coli* das am meisten verwendete System. Dies liegt an den Vorteilen, die Bakterien bieten: schnelles Wachstum, Robustheit, einfache Manipulation und hohe Expressionsraten. Darüber hinaus können intrazelluläre NMR-Experimente mit Bakterien bei recht hohen Temperaturen (37 °C) durchgeführt werden, wodurch die Effekte der höheren intrazellulären Viskosität und anderer Wechselwirkungen wenigstens zum Teil wieder ausgeglichen werden.

Das *E. coli*-System basiert auf der Expression des zu untersuchenden Makromoleküls in isotoopenmarkierten Medien.^[65] Um Hintergrundsignale von Metaboliten und anderen markierten Molekülen aus dem Wachstumsmedium zu entfernen, werden die Zellen vor den intrazellulären NMR-Experimenten intensiv gewaschen. Die bakterielle Probe besteht aus einer dichten Suspension und wird als solche in das NMR-Röhrchen transferiert. Um die Zellen während des Experiments am Leben zu halten, ist generell eine kurze Messzeit (< 3 Stunden) empfohlen, da ansonsten der Mangel an Nährstoffen und Sauerstoff zum Zelltod und dem Platzen von Zellen führen kann.

Tabelle 1: Zusammenfassung von intrazellulären Techniken.

	Intrazelluläre NMR-Spektroskopie	Intrazelluläre Festkörper-NMR-Spektroskopie	Intrazelluläre EPR-Spektroskopie
Markierung	^{15}N , ^{13}C , ^{19}F	^{15}N , ^{13}C	Paramagnetische Spinsonden, höhere Empfindlichkeit
Temperatur	Physiologisch	Kryogen oder physiologisch	Kryogen
Hintergrundsignale	Hoch für ^1H , ^{13}C	Hoch für ^1H , ^{13}C , ^{15}N	Niedrig
Abhängigkeit von Beweglichkeit	Hängt sehr stark von der Rotation ab, Hintergrundsignale für langsam rotierende Moleküle sind nicht detektierbar	Langsam rotierende Moleküle oder Messungen im gefrorenen Zustand	Messungen im gefrorenen Zustand
Strategie	^{15}N Markierung: Analyse der Rückgratsignale alternativ: Detektion selektiv ^{15}N -, ^{13}C - oder ^{19}F -markierter Moleküle	Benötigt die gleichzeitige Markierung mit ^{15}N und ^{13}C , um ^{15}N - ^{13}C -Paare mittels Kreuzpolarisation zu selektieren	Benötigt die Markierung mit Spinsonden
Messgröße	Chemische Verschiebung, Relaxationszeiten, Distanzen	Chemische Verschiebung	Distanzen (1.5–10 nm)
Information	Konformationen, ^[12, 15, 66, 67, 78, 98, 99] Dynamik, ^[36, 76] Wechselwirkungen, ^[11, 16–18, 34, 35, 70, 73, 74, 87, 111] posttranslationale Modifikationen ^[10, 31, 86, 87, 112–115]	Konformationen, ^[22, 37, 38] Wechselwirkungen ^[22, 37, 38]	Distanzen, ^[23, 24, 63, 64, 101] Konformationen, ^[23, 24, 63, 64, 101] Wechselwirkungen, Dynamik

Experimente mit mehreren kleinen Proteinen im bakteriellen Zytoplasma haben gezeigt, dass viele von ihnen in intrazellulären NMR-Experimenten nicht detektierbar sind, verursacht durch ihre Wechselwirkung mit anderen zellulären Komponenten. Die Arbeitsgruppen um Pielak und Gierasch haben dieses Phänomen in Detail untersucht und festgestellt, dass die Rotation, nicht aber die Translation der Makromoleküle erheblich eingeschränkt ist.^[16, 18] Sie folgerten, dass globuläre Proteine mit einer Nettoladung von nahe null nicht-spezifische, schwache Wechselwirkungen im Zellinneren eingehen. Interessanterweise wurde durch eine kürzlich veröffentlichte Studie die allgemeine Annahme, dass der Crowding-Effekt durch Volumenausschluss den kompaktesten molekularen Zustand stabilisiert, durch bakterielle intrazelluläre NMR-Experimente in Frage gestellt.^[66] Während eine Mutante des Proteins ProtL hauptsächlich einen kompakten Zustand in einer verdünnten und mit NaCl versetzten Lösung (0.8M) in vitro annahm, führten schwache Wechselwirkungen im Zellinneren zu einer eher ungefalteten Konformation mit einem größeren hydrodynamischen Radius. Darüber hinaus wurde für DNA-bindende Proteine wie den MetJ-Repressor gezeigt, dass sie nicht-spezifisch an genomische DNA binden, was zu der Annahme führt, dass die Bildung nicht-spezifischer Komplexe eine Rolle beim Verhalten von Proteinen im Zellinneren spielt.^[19]

Bisher gibt es einen einzigen Fall, in dem beschrieben wurde, dass ein intrinsisch nicht-gefaltetes Protein, FlgM, in bakteriellen Zellen eine teilweise α -helikale Konformation einnimmt, während es in vitro vollständig entfaltet vorliegt.^[15] Diese Studie illustrierte das Potential intrazellulärer NMR-Experimente, den konformationellen Zustand von Proteinen in Zellen zu beobachten. Interessanterweise wurde der gegensätzliche Fall kürzlich in intrazellulären NMR-Experi-

menten in *E. coli* mit dem nicht-gefalteten Protein α -Synuclein beschrieben. Während α -Synuclein in der Zelle als ein monomeres, ungefaltetes Protein detektiert wurde,^[67] wurde dasselbe Protein aus roten Blutkörperchen, verschiedenen neuronalen Zelllinien, menschlichem Gewebe sowie unter nicht-denaturierenden Bedingungen aus *E. coli* extrahiert als Tetramer mit α -helikalem Gehalt beschrieben.^[68, 69] Es kann natürlich angebracht werden, dass ein 56 kDa großes, gut strukturiertes Tetramer nicht in intrazellulären NMR-Experimenten sichtbar sein sollte. Allerdings würde man annehmen, dass die Bildung eines derartigen Tetramers im Gleichgewicht mit dem ungefalteten Monomer in den Zellen zu sichtbaren Linienverbreiterungen führen sollte, was jedoch nicht beobachtet wurde. Das Detektieren einer ausschließlich nicht-gefalteten Konformation in Bakterien legt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem Tetramer um ein Artefakt der In-vitro-Bedingungen handelt.

Zusätzlich zu der Untersuchung der physiologisch relevanten Konformation können intrazelluläre NMR-Experimente in Bakterien auch verwendet werden, um Protein-Protein-Wechselwirkungen^[70–72] oder die Bindung von kleinen Molekülen an Makromoleküle zu untersuchen.^[11, 73] STINT-NMR ist eine Technik, bei der zuerst der eine Interaktionspartner exprimiert wird, gefolgt von der Expression des zweiten.^[71, 72] Diese Methode wurde verwendet, um die Fähigkeit kleiner Moleküle zu untersuchen, die Komplexbildung zweier Proteine zu verhindern.^[70] Dabei handelte es sich um Ubiquitin und eine Reihe seiner bekannten Interaktionspartner.^[74] Überraschenderweise erhielten Shekhtman und Mitarbeiter gut aufgelöste intrazelluläre NMR-Spektren von Ubiquitin und Ubiquitin-Komplexen,^[74] während andere Arbeitsgruppen Ubiquitin nicht in Bakterien oder anderen Zellen mittels intrazellulärer NMR-Spektroskopie detektie-

ren konnten, was darauf hindeutet, dass Ubiquitin in Zellen in größeren Komplexen vorliegt.^[11,75]

Flüssig-NMR-Spektroskopie ist eine hervorragende Technik zur Untersuchung der Dynamik von Proteinen und kann im gesamten Dynamikbereich von Pikosekunden bis Sekunden angewendet werden. Die notwendigen Relaxationsexperimente benötigen jedoch hoch konzentrierte Proben und lange Messzeiten. Daher gibt es bisher nur eine Studie, in der die Seitenkettendynamik von Calmodulin in bakteriellen Lysaten untersucht und mit der Dynamik in verdünnten Lösungen verglichen wurde.^[76] Während das Lysat keinen Einfluss auf die schnelle Piko- bis Nanosekundendynamik des Calcium-freien Calmodulins (apo-CaM) hatte, zeigten sich deutliche Unterschiede im Mikro- bis Millisekundenbereich. Die Verringerung der Relaxationsdispersion durch Zugabe eines Metallchelators stützt die Annahme, dass dieser konformationelle Austausch die Dynamik zwischen dem apo-Protein und metallgebundenen Zuständen darstellt. Dieselbe Beobachtung wurde auch für die Calcium-gebundene Form von Calmodulin gemacht. Während die Seitenketten der Calcium-gebundenen Form keine Relaxationsdispersion in In-vitro-Experimenten mit gereinigtem Protein in Puffer zeigten, konnte eine signifikante Dispersion in bakteriellem Lysat gemessen werden. Dieses Ergebnis lässt sich wahrscheinlich mit der schwachen Wechselwirkung verschiedener Komponenten des Lysats mit der Calcium-gebundenen Form erklären. Ob ein Lysat die Dynamik eines Proteins im Zellinneren korrekt widerspiegelt, muss allerdings noch gezeigt werden.

Intrazelluläre NMR-Spektroskopie wurde auch genutzt, um die erste Struktur eines Proteins in lebenden Bakterienzellen durch eine Kombination von 2D- und 3D-NMR-Experimenten mit nicht-linearen Detektionsmethoden zu bestimmen.^[77] Diese nicht-linearen Detektionsmethoden sind notwendig, um die Messzeit signifikant zu reduzieren.^[78] Sehr hohe intrazelluläre Konzentrationen waren notwendig (4 mM), um diese Strukturbestimmung erfolgreich durchzuführen. Obwohl eine intrazelluläre Konzentration von 0.8 mM ausreichend war, um ca. 70 % der Rückgrat-Resonanzen zuzuordnen, ist es gegenwärtig fraglich, ob diese Methode sich auf viele andere Proteine anwenden lässt, da diese sich nicht zu diesen hohen Konzentrationen überexprimieren lassen bzw. bei diesen Konzentrationen noch ausreichend schnell rotieren. Im Allgemeinen leidet die Qualität von intrazellulären NMR-Experimenten, die eine lange Messzeit benötigen, auch unter der Sedimentation der Zellen. Dieses Problem kann jedoch im Prinzip durch die Einbettung der Bakterien in Agarose mit einer niedrigen Schmelztemperatur umgangen werden.^[79–82]

3.2. *Xenopus laevis*

Xenopus laevis-Oozyten sind in der Entwicklungsbiologie und der Elektrophysiologie ein etabliertes Zellsystem. Es waren die ersten eukaryotischen Zellen, die für intrazelluläre NMR-Experimente verwendet wurden.^[9] Der größte Vorteil dieser Oozyten ist ihre Größe (ca. 1 mm), was die Mikroinjektion von Proteinen oder Nukleinsäuren ermöglicht. Eine

typische NMR-Probe besteht aus ungefähr 200 Oozyten, die entweder manuell oder mithilfe eines Injektionsroboters mit je 20–50 nL injiziert werden.^[65] Vorteile dieser Methode sind die sehr viel bessere Kontrolle über die intrazelluläre Konzentration, die Möglichkeit, spezifische Stellen eines Moleküls über chemische Synthese mit Isotopen zu markieren, und die Möglichkeit, andere Modifikationen wie z. B. Spinsonden anzubringen, die nur schwierig in Überexpressionssystemen zu erhalten sind. Zusätzlich erlauben Oozyten Langzeitexperimente, wenn sie in einem Puffer mit Ficoll oder ähnlichen Substanzen suspendiert sind, die den mechanischen Stress durch die Packung der Oozyten in dem NMR-Röhrchen vermindern. Um die Toxizität der injizierten Makromoleküle zu testen, kann der Zustand der Zellen durch Zugabe von Progesteron getestet werden. Dieses Hormon löst die synchronisierte Reifung der Oozyten zu Eiern aus, d. h. von der arretierten Prophase am G2/M-Übergang der ersten meiotischen Teilung zur Metaphase der zweiten meiotischen Teilung. Darüber hinaus können Extrakte von Oozyten oder Eiern einfach und in praktisch unverdünntem Zustand erhalten werden. Diese Extrakte zeigen weiterhin die meisten Funktionen der intakten Zelle.^[83] Daher werden sie häufig als zellfreie Alternative für Ex-vivo-Analysen zellulärer Prozesse verwendet, da sie eine sogar noch bessere Kontrolle der Konzentration der Makromoleküle erlauben und in NMR-Experimenten eine bessere Qualität der Spektren durch eine höhere Homogenität im Vergleich zu Oozyten ermöglichen.^[84,85] Ein Nachteil des *Xenopus laevis*-Oozytensystems im Vergleich zu Bakterien ist, dass die Experimente bei niedrigerer Temperatur (18°C) durchgeführt werden müssen, um die Zellen am Leben zu halten.

Xenopus laevis-Oozyten wurden verwendet, um posttranslationale Modifikationen (PTMs) mit intrazellulärer NMR-Spektroskopie zu untersuchen.^[31,86,87] Um die Phosphorylierung einer bestimmten Proteinsequenz zu studieren, haben Selenko und Mitarbeiter diese Sequenz in einen Loop des kleinen Modellproteins GB1, von dem intrazelluläre NMR-Spektren von hoher Qualität gemessen werden können, eingeführt.^[86] Die Rückgrat-Resonanzsignale eines GB1-Konstrukts, das die regulatorische Sequenz des SV40 large T-Antigens enthielt, wurden in Oozyten und in Ei-Extrakt analysiert. Die Kinase CK2, die sowohl in Oozyten als auch in Eiern aktiv ist, phosphoryliert zwei aufeinanderfolgende Serine in dieser regulatorischen Region. Mithilfe der in Echtzeit durchgeführten intrazellulären NMR-Experimente konnten Selenko und Mitarbeiter zeigen, dass im ersten Schritt CK2 ein spezifisches Serin phosphoryliert, bevor das vorangehende Serin im nächsten Schritt ebenfalls phosphoryliert wird. Dieser Ansatz erlaubte es, den Phosphorylierungsmechanismus von CK2 zu untersuchen; ob jedoch die artifizielle Umgebung als Teil des GB1-Proteins die natürliche Umgebung korrekt widerspiegelt, muss noch untersucht werden.

Bodart und Mitarbeiter benutzten einen anderen Ansatz. Sie untersuchten die Rückgratssignale des nicht gefalteten Proteins Tau in *Xenopus laevis*-Oozyten unter verschiedenen Bedingungen, die zu einer Phosphorylierung verschiedener Aminosäuren führen, konnten jedoch nicht die Kinase, die dafür zuständig ist, identifizieren.^[87] In einer weiteren Un-

tersuchung wurde die sogenannte Unique-Domäne der Kinase Src untersucht. Mithilfe von Echtzeit-NMR-Experimenten in Oozyt- und Ei-Extrakten konnten Amata und Mitarbeiter in Kombination mit Massenspektrometrie und Westernblot-Analyse zeigen, dass S69 und S75 durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) phosphoryliert werden, während S17 von CDKs und PKA in Oozyten modifiziert wurde.^[31]

Vor kurzem haben wir gezeigt, dass auch die Konformation von Nukleinsäuren in *Xenopus laevis*-Oozyten mit intrazellulärer NMR-Spektroskopie untersucht werden kann.^[39,40,88] Diese Untersuchungen zeigten, dass Abbau durch endogene Nukleasen ein ernstes Problem darstellt. Allerdings können Nukleinsäuren durch chemische Modifikationen stabilisiert werden, und Nicht-B-Typ-DNA wie G-Quadruplexe zeigten sich resistent gegenüber Abbau. Wir haben intrazelluläre NMR-Experimente genutzt, um humane G-reiche Sequenzen aus Telomeren zu charakterisieren, die in In-vitro-Experimenten eine große strukturelle Diversität gezeigt hatten.^[89–92] Diese In-vitro-Experimente hatten erbracht, dass die Konformation dieser G-Quadruplexe stark von der Umgebung wie z. B. der Art anwesender einwertiger Kationen oder kleinen organischen Molekülen sowie den Basen am 5'- und 3'-Ende der Quadruplexsequenz abhängt.^[92] Bisher wurden mit NMR-Spektroskopie und Röntgenstrukturanalyse sechs verschiedene Konformationen gefunden, was den polymorphen Charakter dieser telomeren Sequenzen belegt.^[89–92] Dabei wurde auch gezeigt, dass die Simulation von Crowding durch die Zugabe von organischen Molekülen wie PEG200 oder Ethanol die Bildung einer G-Quadruplex-Konformation mit parallelen Strängen initiiert.^[90] Da Crowding eine wesentliche Eigenschaft der zellulären Umgebung ist, wurde daraus geschlossen, dass die parallele Konformation die physiologisch relevante von ungebundener telomerer DNA in vivo sein muss. Interessanterweise hatte auch eine kristallographische Studie die parallele Struktur gefunden, während nur antiparallele Konformationen in verdünnten Lösungen mittels NMR-Spektroskopie beobachtet worden waren.^[93] Dieses Resultat wurde auch so interpretiert, dass die Umgebung in einem Kristall besser den Zustand in einer Zelle inklusive des Crowding simuliert als verdünnte Lösungen.^[90] Allerdings haben unsere intrazellulären NMR-Untersuchungen verschiedener telomerer Sequenzen in Oozyt- und Ei-Extrakten aus *Xenopus laevis* gezeigt, dass unter diesen Bedingungen die parallele Konformation nicht gebildet wird.^[40,88] Stattdessen nahmen die G-Quadruplexe die gleichen Konformationen an, die auch in verdünnten Lösungen gefunden wurden.^[53] Des Weiteren konnten wir zeigen, dass längere telomere Sequenzen, die mehrere G-Quadruplexe auf einem einzelnen Strang ausbilden können, G-Quadruplexe bilden, die sich unabhängig voneinander verhalten.^[53] Mittels ¹⁵N-Markierung spezifischer Guanine konnten wir auch nachweisen, dass jede G-Quadruplexeinheit sowohl in verdünnter Lösung als auch in Ei-Extrakt aus *Xenopus laevis* in zwei verschiedenen Konformationen existiert, nämlich der antiparallelen 2-Tetrad-Korbstruktur und der Hybrid-2-Struktur.^[53]

3.3. Säugerzellen

Ein weiterer Meilenstein der intrazellulären NMR-Spektroskopie war die Detektion der Rückgratsignale von ¹⁵N-markierten gefalteten und nicht-gefalteten Proteinen in Säugerzellen. Da der typische Expressionslevel in Säugerzellen sehr viel niedriger ist als derjenige, der in Bakterien erreicht werden kann, und da aufgrund der im Vergleich zu *Xenopus laevis*-Oozyten geringeren Größe dieser Zellen die Injektion von Makromolekülen keine brauchbare Option ist, mussten zuerst neue Verfahren etabliert werden, die die benötigte hohe intrazelluläre Konzentration ermöglichten. Hierzu haben die Arbeitsgruppen um Shirakawa und Shimada verschiedene Methoden entwickelt, um isotonenmarkierte Makromoleküle in adhärenenten bzw. in Suspension wachsenden Zellen anzureichern.^[10,11]

In der von Shirakawa und Mitarbeitern entwickelten Methode wird das zu untersuchende Makromolekül C-terminal an ein Konstrukt aus dem zellmembrandurchlässigen Tat-Peptid (CPP) und Ubiquitin fusioniert. Während CPP dafür sorgt, dass das Gesamtkonstrukt sich an das Äußere der Zelle anlagert, um dann effizient durch die Membran geschleust zu werden, wird Ubiquitin im Zellinneren von endogenen Ubiquitin-spezifischen C-terminalen Proteasen (DUBs) erkannt. Nach dem Abschneiden des Ubiquitins ist das zu untersuchende Protein frei im Zytoplasma der Zelle.^[75] Alternativ kann CPP direkt über eine Disulfidbrücke an ein N-terminales Cystein im zu untersuchenden Protein fusioniert werden. Im reduzierenden Milieu des Zellinneren wird diese Bindung gespalten. In intrazellulären NMR-Experimenten können nur Proteine detektiert werden, deren CPP entfernt wurde, da sie sonst mit der Membran assoziiert bleiben und nicht schnell genug rotieren.

Diese intrazelluläre CPP-Methode wurde verwendet, um Spektren zweier Modellproteine zu messen, eine Ubiquitin-Mutante, die die Fähigkeit verloren hat, schwache, nicht-spezifische Wechselwirkungen einzugehen, und die cis-trans-Prolyl-Isomerase FKBP12.^[11] Die Autoren konnten auch Veränderungen der chemischen Verschiebungen von FKBP12 nach der Zugabe des Inhibitors FK506 beobachten, was zeigt, dass auch in Säugerzellen die Wechselwirkung von Proteinen mit kleinen Liganden mit intrazellulärer NMR-Spektroskopie studiert werden kann. Darüber hinaus wurden sowohl Wildtyp-Ubiquitin als auch die Mutante in einer deuterierten Form in HeLa-Zellen transduziert und die Austauschgeschwindigkeiten der Amidprotonen sowohl intrazellulär als auch im Zelllysate gemessen. Diese Experimente zeigten einen schnelleren Austausch im zellulären Kontext als in In-vitro-Experimenten. Dabei tauschte Wildtyp-Ubiquitin signifikant schneller aus als die Mutante, die nicht zu schwachen nicht-spezifischen Wechselwirkungen mit anderen zellulären Komponenten fähig ist. Dieses Ergebnis suggeriert, dass die Fähigkeit von Ubiquitin, mit anderen Proteinen schwache Wechselwirkungen einzugehen, das Protein weniger stabil macht. Dies stimmt mit Ergebnissen von Pielak und Mitarbeitern überein, die gezeigt hat, dass Proteine, die schwache Wechselwirkungen zeigen, weniger stabil und Proteine, die nicht stark wechselwirken, eher stabil und kompakt sind.^[4]

Ein Nachteil dieser Methode ist, dass verschiedene CPP-Sequenzen, inklusive der Tat-Sequenz, moderat toxische Effekte auf Säugerzellen haben können. Derartiger zellulärer Stress kann zu Änderungen im Metabolismus einer Zelle führen, was wiederum die Ergebnisse von intrazellulären NMR-Experimenten beeinflussen kann. Um den Zustand der Zellen zu überwachen, haben die Autoren nach jedem intrazellulären NMR-Experiment die Integrität der Zellen mittels Trypanblau-Färbung untersucht, was zeigte, dass mehr als 90 % der Zellen jeweils lebten. Dieser Test kann jedoch keine Auskunft über Änderungen im Zellinneren, z.B. im Metabolismus geben. Kürzlich wurde gezeigt, dass der zytoplasmatische pH-Wert von mit CPP behandelten Säugerzellen signifikant niedriger ist als der von nicht behandelten Zellen (6.2 ± 0.2).^[94] Die Autoren spekulieren, dass diese Azidifizierung eine Folge des Mangels an Sauerstoff in den intrazellulären Proben in den NMR-Röhrchen ist. Im Prinzip kann der intrazelluläre pH-Wert ebenfalls mit intrazellulären NMR-Experimenten gemessen werden. Eine Möglichkeit ist es, Kopplungskonstanten innerhalb des Histidinrings zu messen, die sensitiv gegenüber dem Protonierungs- und Tautomerisierungszustand sind. Mithilfe derartiger Messungen in Histonrängen des Proteins NmerA wurde der pH-Wert im Zytoplasma von lebenden Bakterien gemessen (7.1).^[95] Die Messung des pH-Wertes wird in Zukunft wichtig sein, um Fehlinterpretationen von Resultaten aus intrazellulären NMR-Experimenten zu vermeiden.

Eine Alternative zum CPP-basierten System wurde von Shimada und Mitarbeitern entwickelt, um markierte Proteine in HEK293F-Suspensionszellen anzureichern.^[10] Vor der eigentlichen Transduktion wurden die Zellen mit dem induzierbaren, porenbildenden Toxin Streptolysin O (SLO) behandelt, das sich bei niedrigen Temperaturen (4°C) an der Membran anlagert. Nach der Zugabe des markierten, zu untersuchenden Proteins zur Lösung (Konzentration ca. 1 mM) wurde Porenbildung und somit Transduktion durch eine 30-minütige Inkubation bei höheren Temperaturen (37°C) induziert. Durch SLO gebildete Poren werden Makromoleküle mit einer Größe von bis zu 150 kDa durchgelassen.^[96] Sind Poren erst einmal gebildet, so führt die hohe Konzentration der Makromoleküle außerhalb der Zellen zu einer intrazellulären Anreicherung durch passive Diffusion. Um die Poren wieder zu schließen und intrazelluläre NMR-Experimente durchzuführen, werden die Zellen mit Calcium behandelt, wodurch die Internalisierung der Poren initiiert wird. Ähnlich der Trypanblau-Färbemethode kann die Zellviabilität mit Durchflusszytometrie gemessen und die Aufnahme von Propidiumiodid ermittelt werden, was häufig für die Untersuchung von apoptotischen Zellen verwendet wird.^[10] Der Vorteil der Durchflusszytometrie ist, dass zusätzlich zur Untersuchung der Zellviabilität die Transduktionseffizienz gleichzeitig untersucht werden kann. Dies ist besonders während der Optimierungsphase von Vorteil, um die höchste Transduktionsrate und niedrigste Zellsterblichkeit zu erreichen.^[10] Die Autoren konnten auch zeigen, dass während des intrazellulären NMR-Experiments nur vernachlässigbare Mengen ihres markierten Proteins aus den Zellen wieder in das umgebende Medium gelangten. Obwohl die Transduktionseffizienz pro Zelle hoch genug ist (50 μ M), um 2D-NMR-

Experimente eines nicht-gefalteten Proteins durchzuführen, zeigte die Analyse, dass nur 50 % der Zellen das Protein enthielten. Unter Mitberechnung des Puffervolumens und der Anzahl der Zellen schätzten die Autoren, dass die Konzentration des Proteins über das gesamte relevante Volumen in der Detektionsspule gerechnet nur 4 μ M betrug, was die Anwendbarkeit dieser Methode für Moleküle, die langsamer rotieren als nicht-gefaltete Proteine in Frage stellt. Allerdings publizierte dieselbe Gruppe kürzlich ein verbessertes Protokoll, das es ihnen erlaubte, die Konformation und die Wechselwirkungsoberfläche von langsam rotierenden Proteinen mithilfe der Markierung von Methylgruppen und Detektion mittels TROSY- und sf-HMQC-Experimenten zu untersuchen.^[82]

Um zeitaufwendige und komplizierte intrazelluläre NMR-Experimente wie z.B. TCS-Experimente (transfer cross saturation)^[97] durchzuführen, haben Shimada und Mitarbeiter einen Bioreaktor verwendet, der die Zellen konstant mit frischem Medium während der intrazellulären NMR-Experimente versorgt.^[82] Die Autoren zeigten auch, dass ihre mit SLO behandelten Zellen in intrazellulären NMR-Experimenten ohne konstanten Austausch des Mediums Änderungen in ihrer ATP-Konzentration und eine signifikante Anreicherung markierter Proteine im umgebenden Medium zeigten. Der Bioreaktor hingegen hielt die zellulären Bedingungen für 5–6 Stunden konstant und entfernte markierte Proteine aus dem Medium, die ansonsten zu einem falschen (weil nicht intrazellulären) Signal beigetragen könnten. Mithilfe dieses Bioreaktors wurde die Interaktionsoberfläche einer 9 kDa großen Mikrotubuli-bindenden Domäne mittels TCS in Zellen bestimmt.^[82]

Ursprünglich wurde der intrazelluläre Expressionslevel von Säugerzellen als zu gering eingestuft, um die für intrazelluläre NMR-Experimente notwendigen Konzentrationen zu erreichen. Allerdings wurde kürzlich gezeigt, dass mit Plasmidtransfektion und transienter Überexpression eine Konzentration von $360 \pm 30 \mu$ M nicht-gefalteter sowie gefalteter Proteine in adhärenenten HEK293T-Zellen erreicht werden kann.^[98] Die Konzentration hängt direkt von der Menge des eingesetzten Plasmids ab. Um eine hohe Transfektionseffizienz zu erreichen, wurden die Plasmide mit Polyethylenimin (PEI) vor der Transfektion komplexiert. Dieser Überexpressionsansatz wurde verwendet, um den vollständigen posttranslationalen Reifungsprozess der humanen Superoxid-Dismutase 1 (SOD1)^[99] zu beobachten. Sowohl 1D-¹H-NMR- als auch intrazelluläre 2D-[¹⁵N, ¹H]-sfHMQC-NMR-Experimente wurden verwendet, um Zink-Bindung, die Bildung von Homodimeren und die Aufnahme von Kupferionen zu verfolgen. Coexpression des Kupfer-Chaperons für SOD1 (CCS) induzierte die Oxidation und Bildung der Disulfidbrücke, was zeigt, dass das Konzept der STINT-NMR für die Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen auch in intrazellulären NMR-Experimenten mit Säugerzellen einsetzbar ist.

3.4. Hefe- und Insektenzellen

Zusätzlich zu den *Xenopus laevis*-Oozyten und verschiedenen Säugerzelllinien, wurden Hefe- und Insektenzellen kürzlich auf ihre Anwendbarkeit in intrazellulären NMR-Experimenten mit eukaryotischen Zellen getestet.^[12,13] Shekhtman und Mitarbeiter untersuchten überexprimiertes Ubiquitin in der Hefe *Pichia pastoris*.^[13] Überexpression für 48 Stunden und einen zusätzlichen Zeitraum von 6 Stunden mit reduzierten Nährstoffen war notwendig, um ein gut aufgelöstes [¹⁵N, ¹H]-HSQC-Spektrum von Ubiquitin zu messen. Allerdings zeigten diese Spektren einen signifikanten Level an Hintergrundsignalen und belegten, dass die Interpretation von Signalen im Bereich zwischen 7–8.5 ppm durch den Überlapp mit diesen Hintergrundsignalen erschwert wird. Erstaunlicherweise verschwanden durch die Verwendung verschiedener Nährmedien alle gut aufgelösten Resonanzsignale, was entweder bedeutet, dass Ubiquitin abgebaut wird oder an andere, große zelluläre Komponenten bindet. Immunfluoreszenzexperimente zeigten, dass unter diesen Bedingungen Ubiquitin in Proteinspeicherkörper eingelagert wurde. Diese Einlagerung ist nicht Ubiquitin-spezifisch, da in Abhängigkeit von den verwendeten Nährmedien auch β -Galactosidase eingelagert wurde. Im Gegensatz zu *Pichia pastoris* bedurften Sf9-Insektenzellen nur 24–25 Stunden Überexpression und in den intrazellulären NMR-Spektren zeigte sich im Vergleich zu den Hefespektren ein erheblich reduziertes Hintergrundsignal im Bereich von 7–8.5 ppm.^[12] Die spektrale Qualität konnte weiter durch Subtraktion der Hintergrundsignale, gemessen mit Zellen, die kein Protein überexprimieren, verbessert werden. Die Qualität der erhaltenen Spektren erlaubte die Aufnahme von 3D-Triple-Resonanzexperimenten und die Zuordnung von ca. 80 % der Rückgratsignale. Da jedoch die meisten bisher mit intrazellulärer NMR-Spektroskopie untersuchten Proteine schwache, nicht-spezifische Wechselwirkungen mit der zellulären Umgebung eingehen, ist es fraglich, für wie viele Proteine NMR-Experimente jenseits der 1D- und 2D-Varianten möglich sein werden.

3.5. Intrazelluläre EPR-Spektroskopie von Proteinen und Nukleinsäuren

EPR-Spektroskopie kann nicht den gleichen Grad an Detailinformation über die Konformation und Dynamik von Makromolekülen liefern wie NMR-Spektroskopie. Die Vorteile der EPR-Spektroskopie sind jedoch ihre größere Empfindlichkeit, der Mangel an Hintergrundsignalen und die Möglichkeit, mit der PELDOR-EPR-Methode Distanzen unabhängig von der Rotationsgeschwindigkeit des Moleküls und damit von seiner Größe zu messen.^[23,62] Die Detektion eines Makromoleküls in zellulärer Umgebung setzt die Markierung des Makromoleküls mit einer Spinsonde (meistens MTSL, gebunden an ein Cystein im Falle von Proteinen) voraus. Die Messung von Distanzen benötigt das Anbringen von zwei Spinsonden an unterschiedlichen Stellen im Molekül. Bisher wurden in *Xenopus laevis*-Oozyten Distanzen (1.5–8 nm) zwischen an Ubiquitin oder Nukleinsäuren ange-

brachten Spinsonden gemessen.^[23,24] Längere Distanzen von bis zu 10 nm wurden bereits mit deuterierten Proteinen gemessen.^[100] Anstatt 200 Oozyten, wie sie für intrazelluläre NMR-Experimente notwendig sind, werden für intrazelluläre EPR-Experimente nur 30–50 injizierte Oozyten verwendet. Die Injektion und das Fertigstellen der Probe kann in 10–15 Minuten geschehen. Distanzmessungen mittels PELDOR-Experimenten funktionieren am besten, wenn die Makromoleküle möglichst unbeweglich sind, da die Flexibilität der Spinsonden und konformationelle Flexibilität der Makromoleküle die Distanzinformation weniger genau machen. Daher werden die Proben typischerweise schockgefroren bevor sie bei 50 K gemessen werden.

Igarashi und Mitarbeiter stellten fest, dass die Nitroxid-Spinsonden an den Makromolekülen schnell reduziert wurden, sobald sie in das zelluläre Milieu eingebracht wurden, und dabei eine ungefähre Halbwertszeit von einer Stunde hatten.^[24] In ihrer Pilotstudie zeigten sie weiterhin, dass Spinsonden-markiertes Ubiquitin mittels intrazellulärer PELDOR-EPR beobachtet werden kann. Injektion in Oozyten und sofortige Messung resultierte in Distanzprofilen, die praktisch identisch mit denen aus In-vitro-Experimenten waren. Messungen, die erst nach einer Stunde Inkubationszeit bei einer physiologischen Temperatur (18°C) aufgenommen wurden, zeigten ein geringes Signal-Rausch-Verhältnis (Modulationstiefe). Diese Verringerung der Modulationstiefe ist erwartet, da vom Augenblick der Injektion an die Spinsonden von kleinen Molekülen und Enzymen reduziert werden, wodurch sich das EPR-Signal verringert.

Mithilfe der intrazellulären EPR-Spektroskopie haben wir verschiedene mit Spinsonden markierte DNA- und RNA-Moleküle untersucht und PELDOR-Experimente durchgeführt.^[23] Während alle drei untersuchten Nukleinsäuren sehr ähnliche Distanzprofile intrazellulär und in vitro zeigten, ergaben PELDOR-Messungen an einem DNA-Duplex eine zusätzliche, längere Distanz, die in In-vitro-Experimenten nicht zu sehen war. Diese Distanz zeigte auch eine recht breite Verteilung. Die Beobachtung, dass die Modulationstiefe der intrazellulären Signale deutlich tiefer als erwartet war, suggerierte, dass dipolare Wechselwirkungen von mehr als zwei Spinsonden zugrunde lagen.^[23] Dies führte uns zu der Mutmaßung, dass die DNA-Duplexe in den Zellen sowohl einzeln als auch als multimere Duplexe vorliegen.

Intrazelluläre EPR-Experimente mit Nukleinsäuren wurden auch von Drescher und Mitarbeitern publiziert.^[62,63,101] 7-mer DNA-Duplexe wurden am 5'-Ende mit einem hexacyclischen Nitroxid markiert und in *Xenopus laevis*-Oozyten injiziert. Im Unterschied zu der intrazellulären Halbwertszeit in unserer Studie (50–60 min) betrug die Halbwertszeit der von Azarkh und Mitarbeitern untersuchten Spinsonden-markierten DNA nur 1.1 min. Der Unterschied in den Halbwertszeiten konnte auf die verschiedenen Spinsonden zurückgeführt werden, die in den beiden Studien verwendet wurden.^[63] Sowohl Azarkh und Mitarbeiter als auch wir konnten zeigen, dass pentacyclische Nitroxide in Zellen sehr viel stabiler gegen Reduktion sind als hexacyclische Nitroxide.^[23,101] Die Untersuchung der 7-meren DNA-Sequenz zeigte, dass anders als bei der In-vitro-Situation, in der ein definierter Duplexzustand beobachtet wird, die breite

in Zellen gemessene Distanzverteilung das Vorliegen einer „geschmolzenen“ DNA nahelegt.^[63]

4. Perspektiven der intrazellulären NMR-Spektroskopie

Keine andere spektroskopische Methode ist fähig, die gleiche Menge an detaillierter Information über den konformationellen Zustand und die Dynamik von biologischen Makromolekülen zu liefern wie die NMR-Spektroskopie. Diese Fähigkeit, kombiniert mit der geringen Energie der Radiofrequenzpulse und ihrem nicht-invasiven Charakter machen die NMR-Spektroskopie zur perfekten Methode, um Makromoleküle in ihrer natürlichen Umgebung zu untersuchen. Bislang wurden detaillierte Protokolle für die Verwendung vieler verschiedener Zelltypen entwickelt und etabliert, inklusive Bakterienzellen, Säugerzellen und anderen eukaryotischen Zellen.^[12, 13, 102–105] Der Vorteil der geringen Energie, die für die Anregung benötigt wird, ist aber gleichzeitig auch der größte Nachteil der NMR-Spektroskopie. Eine geringe Anregungsenergie korreliert mit einem kleinen Energieunterschied zwischen dem Grundzustand und dem angeregten Zustand, was zu einem nur geringen Populationsüberschuss im Grundzustand führt und die der NMR-Spektroskopie inhärente geringe Empfindlichkeit begründet. Um diese geringe Empfindlichkeit zu überwinden, müssen NMR-Proben normalerweise eine Konzentration im oberen mikromolaren oder sogar noch höheren Bereich aufweisen. Die größte Herausforderung für die intrazelluläre NMR-Spektroskopie wird in Zukunft darin bestehen, Experimente bei intrazellulären Konzentrationen durchzuführen, die nahe an der natürlichen Konzentration sind. In den meisten Fällen ist dies im oberen nanomolaren bis unteren mikromolaren Bereich. Die nächste Generation von Ultrahochfeld-NMR-Spektrometern und Kryoprobenköpfen wird mit Sicherheit das Problem weiter reduzieren, aber weitere technische Entwicklungen werden notwendig sein, um den natürlichen Expressionslevel tatsächlich zu erreichen. Dynamische Kernpolarisation (DNP) kann die Empfindlichkeit von Festkörper-NMR-Experimenten drastisch erhöhen,^[106] und erste DNP-Anwendungen für die Untersuchung von Membranproteinen in Membranpräparationen sind bereits publiziert.^[107] Deuterierung und die Fokussierung auf Methylgruppen kann ebenfalls die Notwendigkeit hoher Konzentrationen in Flüssig-NMR-Anwendungen reduzieren. Nur wenn das Ziel, nahe an die natürlichen Konzentrationen heranzukommen, erreicht werden kann, wird intrazelluläre NMR-Spektroskopie in der Lage sein, Informationen über spezifische Wechselwirkungen der untersuchten Makromoleküle zu liefern. Für alle intrazellulären NMR-Experimente, die höhere intrazelluläre Konzentrationen verwenden, muss die biologische Relevanz der Daten in jedem Einzelfall überdacht werden. Zusätzlich zu der intrazellulären Konzentration spielt auch die Lokalisation in einer Zelle eine sehr wichtige Rolle. Proteine oder Nukleinsäuren, die nicht in ihrem korrekten zellulären Kompartiment sind, werden sich anders verhalten. Für kleine Nukleinsäuren wurde bereits gezeigt, dass sie sich nach Injektion in das Zytoplasma im

Zellkern anreichern.^[108–110] Für die meisten Proteine wird angenommen, dass sie sich im Zytoplasma aufhalten.^[98] In der Zukunft werden allerdings genauere Untersuchungen zu dieser Frage notwendig sein, um sicherzustellen, dass physiologisch richtige Experimente durchgeführt werden.

Eine weitere Herausforderung ist, dass die Bildung spezifischer Komplexe, aber auch nicht-spezifische Wechselwirkungen mit anderen zellulären Komponenten die Rotationskorrelationszeit erhöht,^[16–18] was zu Linienverbreiterung oder gar dem völligen Verschwinden der Signale führt. Die Detektion von Methylgruppen kann auch dieses Problem teilweise beheben, aber falls die Rotation zu langsam wird, lassen sich auch Methylgruppen nicht mehr detektieren. In diesen Fällen könnte intrazelluläre Festkörper-NMR-Spektroskopie die Alternative sein. Um die Empfindlichkeit der Messungen zu erhöhen, die auf dem Magnetisierungstransfer über dipolare Kopplungen beruhen, werden diese Experimente am besten bei tiefen Temperaturen mit gefrorenen Proben durchgeführt. Die meisten Zellen werden das Einfrieren nicht überleben, und das Ziel von intrazellulärer Festkörper-NMR-Spektroskopie ist, eher einen bestimmten zellulären Zustand zu erreichen und diesen dann durch rasches Einfrieren zu konservieren. Die Zellen in einem gefrorenen Zustand zu halten, verlangsamt auch oder verhindert sogar vollständig zelluläre Prozesse wie z.B. den Abbau und macht somit längere Messzeiten möglich. Da die meisten Festkörper-NMR-Experimente ¹³C- oder ¹⁵N-Detektion benutzen und die Detektion dieser Kerne deutlich weniger empfindlich ist als die in Flüssig-NMR-Experimenten meist verwendete ¹H-Detektion, sind längere Messzeiten für intrazelluläre Festkörper-NMR notwendig. Die Untersuchung von Membranproteinen oder anderen Molekülen, die sich nur sehr langsam bewegen, kann auch bei Temperaturen oberhalb von 0°C geschehen, abhängig von der Effizienz der Magnetisierungsübertragung über dipolare Kopplungen und der Stabilität des zellulären Systems bei diesen Temperaturen.

Gleichfalls werden intrazelluläre PELDOR-EPR-Experimente mit eingefrorenen zellulären Proben durchgeführt (mit wenigen Ausnahmen). Das größte Problem für intrazelluläre EPR ist die schnelle chemische Reduktion der gegenwärtig verfügbaren Spinsonden in der zellulären Umgebung, was die Messzeit begrenzt. Sterisch besser geschützte Spinsonden werden gerade entwickelt und werden in der Zukunft einen erheblichen Einfluss auf mögliche Anwendungen der intrazellulären EPR-Spektroskopie haben.

Schließlich wird die bessere Überwachung des zellulären Zustands während der NMR-Messungen wichtig sein, um physiologisch relevante Ergebnisse zu erzielen. Um Zellen in einem definierten metabolischen Zustand zu halten, wird die Weiterentwicklung von Bioreaktoren, die Sauerstoff-, CO₂- und Nährstoff-Konzentrationen konstant halten, essentiell sein. Mit derartigen Bioreaktoren und somit stabilen Bedingungen werden auch längere Experimente wie z.B. Relaxationsexperimente oder Messungen mit geringen intrazellulären Konzentrationen in Zukunft möglich sein.

Diese Arbeit wurde durch das Center for Biomolecular Magnetic Resonance, den Exzellenzcluster Frankfurt (Makro-

molekulare Komplexe) und die Grant Agency der Tschechischen Republik (Projekt: 13-28310S) unterstützt.

Eingegangen am 31. Dezember 2013

Online veröffentlicht am 28. Juli 2014

- [1] R. J. Ellis, *Trends Biochem. Sci.* **2001**, 26, 597–604.
- [2] A. Gershenson, L. M. Gierasch, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2011**, 21, 32–41.
- [3] A. H. Elcock, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, 20, 196–206.
- [4] M. Sarkar, C. Li, G. J. Pielak, *Biophys. Rev.* **2013**, 5, 187–194.
- [5] H. X. Zhou, G. Rivas, A. P. Minton, *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, 37, 375–397.
- [6] Z. Serber, V. Dötsch, *Biochemistry* **2001**, 40, 14317–14323.
- [7] Z. Serber, R. Ledwidge, S. M. Miller, V. Dötsch, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 8895–8901.
- [8] J. M. Wieruszkeski, A. Bohin, J. P. Bohin, G. Lippens, *J. Magn. Reson.* **2001**, 151, 118–123.
- [9] P. Selenko, Z. Serber, B. Gadea, J. Ruderman, G. Wagner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 11904–11909.
- [10] S. Ogino, S. Kubo, R. Umemoto, S. Huang, N. Nishida, I. Shimada, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 10834–10835.
- [11] K. Inomata, A. Ohno, H. Tochio, S. Isogai, T. Tenno, I. Nakase, T. Takeuchi, S. Futaki, Y. Ito, H. Hiroaki, M. Shirakawa, *Nature* **2009**, 458, 106–109.
- [12] J. Hamatsu, D. O'Donovan, T. Tanaka, T. Shirai, Y. Hourai, T. Mikawa, T. Ikeya, M. Mishima, W. Boucher, B. O. Smith, E. D. Laue, M. Shirakawa, Y. Ito, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 1688–1691.
- [13] K. Bertrand, S. Reverdatto, D. S. Burz, R. Zitomer, A. Shekhtman, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 12798–12806.
- [14] S. Kosol, S. Contreras-Martos, C. Cedeño, P. Tompa, *Molecules* **2013**, 18, 10802–10828.
- [15] M. M. Dedmon, C. N. Patel, G. B. Young, G. J. Pielak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 12681–12684.
- [16] Q. Wang, A. Zhuravleva, L. M. Gierasch, *Biochemistry* **2011**, 50, 9225–9236.
- [17] L. M. Luh, R. Hänsel, F. Löhr, D. K. Kirchner, K. Krauskopf, S. Pitzius, B. Schäfer, P. Tufar, I. Corbeski, P. Güntert, V. Dötsch, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 13796–13803.
- [18] Y. Wang, C. Li, G. J. Pielak, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 9392–9397.
- [19] A. M. Augustus, P. N. Reardon, L. D. Spicer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 5065–5069.
- [20] M. Sarkar, A. E. Smith, G. J. Pielak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, 110, 19342–19347.
- [21] Z. Serber, W. Straub, L. Corsini, A. M. Nomura, N. Shimba, C. S. Craik, P. Ortiz de Montellano, V. Dötsch, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 7119–7125.
- [22] S. Reckel, J. J. Lopez, F. Löhr, C. Glaubitz, V. Dötsch, *ChemBioChem* **2012**, 13, 534–537.
- [23] I. Krstic, R. Hänsel, O. Romainczyk, J. W. Engels, V. Dötsch, T. F. Prisner, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 5176–5180; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 5070–5074.
- [24] R. Igarashi, T. Sakai, H. Hara, T. Tenno, T. Tanaka, H. Tochio, M. Shirakawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 8228–8229.
- [25] O. Schiemann, T. F. Prisner, *Q. Rev. Biophys.* **2007**, 40, 1–53.
- [26] G. Jeschke, Y. Polyach, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, 9, 1895–1910.
- [27] G. W. Reginsson, O. Schiemann, *Biochem. J.* **2011**, 434, 353–363.
- [28] I. Bertini, I. C. Felli, L. Gonnelli, M. V. V. Kumar, R. Pierattelli, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 2387–2389; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 2339–2341.
- [29] Z. Serber, L. Corsini, F. Durst, V. Dötsch, *Methods Enzymol.* **2005**, 394, 17–41.
- [30] Y. Ye, X. Liu, Z. Zhang, Q. Wu, B. Jiang, L. Jiang, X. Zhang, M. Liu, G. J. Pielak, C. Li, *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 12705–12710.
- [31] I. Amata, M. Maffei, A. Igea, M. Gay, M. Vilaseca, A. R. Nebreda, M. Pons, *ChemBioChem* **2013**, 14, 1820–1827.
- [32] E. A. Cino, M. Karttunen, W. Y. Choy, *PLoS One* **2012**, 7, e49876.
- [33] C. Li, L. M. Charlton, A. Lakkavaram, C. Seagle, G. Wang, G. B. Young, J. M. Macdonald, G. J. Pielak, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 6310–6311.
- [34] P. B. Crowley, E. Chow, T. Papkovskaia, *ChemBioChem* **2011**, 12, 1043–1048.
- [35] M. P. Latham, L. E. Kay, *J. Biomol. NMR* **2013**, 55, 239–247.
- [36] C. Li, G. F. Wang, Y. Wang, R. Creager-Allen, E. A. Lutz, H. Scronce, K. M. Slade, R. A. Ruf, R. A. Mehl, G. J. Pielak, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 321–327.
- [37] T. Jacso, W. T. Franks, H. Rose, U. Fink, J. Broecker, S. Keller, H. Oschkinat, B. Reif, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 447–450; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 432–435.
- [38] M. Renault, R. Tommassen-van Bostel, M. P. Bos, J. A. Post, J. Tommassen, M. Baldus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, 109, 4863–4868.
- [39] R. Hänsel, S. Foldynová-Trantírková, F. Löhr, J. Buck, E. Bongartz, E. Bamberg, H. Schwalbe, V. Dötsch, L. Trantírek, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 15761–15768.
- [40] R. Hänsel, S. Foldynová-Trantírková, V. Dötsch, L. Trantírek, *Top. Curr. Chem.* **2013**, 330, 47–65.
- [41] R. M. Daniel, R. V. Dunn, J. L. Finney, J. C. Smith, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2003**, 32, 69–92.
- [42] S. C. Kamerlin, A. Warshel, *Proteins* **2010**, 78, 1339–1375.
- [43] J. Villali, D. Kern, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, 14, 636–643.
- [44] V. C. Nashine, S. Hammes-Schiffer, S. J. Benkovic, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, 14, 644–651.
- [45] I. R. Kleckner, M. P. Foster, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2011**, 1814, 942–968.
- [46] M. J. Grey, C. Wang, A. G. Palmer III, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14324–14335.
- [47] P. Vallurupalli, D. F. Hansen, L. E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 2734–2735.
- [48] D. F. Hansen, P. Vallurupalli, L. E. Kay, *J. Biomol. NMR* **2008**, 41, 113–120.
- [49] Y. Li, A. G. Palmer III, *J. Biomol. NMR* **2009**, 45, 357–360.
- [50] Y. Takaoka, Y. Kioi, A. Morito, J. Otani, K. Arita, E. Ashihara, M. Ariyoshi, H. Tochio, M. Shirakawa, I. Hamachi, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 2801–2803.
- [51] Y. Bai, J. J. Englander, L. Mayne, J. S. Milne, S. W. Englander, *Methods Enzymol.* **1995**, 259, 344–356.
- [52] M. Adrian, B. Heddi, A. T. Phan, *Methods* **2012**, 57, 11–24.
- [53] R. Hänsel, F. Löhr, L. Trantírek, V. Dötsch, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 2816–2824.
- [54] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 6394–6400.
- [55] G. W. Reginsson, O. Schiemann, *Biochem. Soc. Trans.* **2011**, 39, 128–139.
- [56] E. Bordignon, *Top. Curr. Chem.* **2012**, 321, 121–157.
- [57] S. Longhi, V. Belle, A. Fournel, B. Guigliarelli, F. Carrière, *J. Pept. Sci.* **2011**, 17, 315–328.
- [58] O. Schiemann, N. Piton, J. Plackmeyer, B. E. Bode, T. F. Prisner, J. W. Engels, *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 904–923.
- [59] M. J. Schmidt, J. Borbas, M. Drescher, D. Summerer, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 1238–1241.
- [60] C. C. Liu, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, 79, 413–444.
- [61] Z. Yang, Y. Liu, P. Borbat, J. L. Zweier, J. H. Freed, W. L. Hubbell, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 9950–9952.
- [62] M. Azarkh, V. Singh, O. Okle, I. T. Seemann, D. R. Dietrich, J. S. Hartig, M. Drescher, *Nat. Protoc.* **2013**, 8, 131–147.

- [63] M. Azarkh, O. Okle, V. Singh, I. T. Seemann, J. S. Hartig, D. R. Dietrich, M. Drescher, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1992–1995.
- [64] I. T. Holder, M. Drescher, J. S. Hartig, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 6156–6161.
- [65] Z. Serber, P. Selenko, R. Hänsel, S. Reckel, F. Löhr, J. E. Ferrell, Jr., G. Wagner, V. Dötsch, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2701–2709.
- [66] A. P. Schlesinger, Y. Wang, X. Tadeo, O. Millet, G. J. Pielak, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8082–8085.
- [67] A. Binolfi, F. X. Theillet, P. Selenko, *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, *40*, 950–954.
- [68] T. Bartels, J. G. Choi, D. J. Selkoe, *Nature* **2011**, *477*, 107–110.
- [69] W. Wang, I. Perovic, J. Chittuluru, A. Kaganovich, L. T. Nguyen, J. Liao, J. R. Auclair, D. Johnson, A. Landru, A. K. Simorellis, S. Ju, M. R. Cookson, F. J. Asturias, J. N. Agar, B. N. Webb, C. Kang, D. Ringe, G. A. Petsko, T. C. Pochapsky, Q. Q. Hoang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 17797–17802.
- [70] D. S. Burz, A. Shekhtman, *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2010**, Chap. 17, Unit 17.11.
- [71] D. S. Burz, K. Dutta, D. Cowburn, A. Shekhtman, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 91–93.
- [72] D. S. Burz, K. Dutta, D. Cowburn, A. Shekhtman, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 146–152.
- [73] J. A. Hubbard, L. K. MacLachlan, G. W. King, J. J. Jones, A. P. Fosberry, *Mol. Microbiol.* **2003**, *49*, 1191–1200.
- [74] D. S. Burz, A. Shekhtman, *PLoS One* **2008**, *3*, e2571.
- [75] T. Sakai, H. Tochio, T. Tenno, Y. Ito, T. Kokubo, H. Hiroaki, M. Shirakawa, *J. Biomol. NMR* **2006**, *36*, 179–188.
- [76] M. P. Latham, L. E. Kay, *PLoS One* **2012**, *7*, e48226.
- [77] D. Rovnyak, D. P. Frueh, M. Sastry, Z. Y. Sun, A. S. Stern, J. C. Hoch, G. Wagner, *J. Magn. Reson.* **2004**, *170*, 15–21.
- [78] D. Sakakibara, A. Sasaki, T. Ikeya, J. Hamatsu, T. Hanashima, M. Mishima, M. Yoshimasu, N. Hayashi, T. Mikawa, M. Walchli, B. O. Smith, M. Shirakawa, P. Guntert, Y. Ito, *Nature* **2009**, *458*, 102–105.
- [79] K. A. McGovern, J. S. Schoeniger, J. P. Wehrle, C. E. Ng, J. D. Glickson, *Magn. Reson. Med.* **1993**, *29*, 196–204.
- [80] W. Egan, M. Barile, S. Rottem, *FEBS Lett.* **1986**, *204*, 373–376.
- [81] S. Reckel, F. Löhr, V. Dötsch, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1601–1606.
- [82] S. Kubo, N. Nishida, Y. Udagawa, O. Takarada, S. Ogino, I. Shimada, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 1246–1249; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1208–1211.
- [83] P. Selenko, G. Wagner, *J. Struct. Biol.* **2007**, *158*, 244–253.
- [84] R. F. Crane, J. V. Ruderman, *Methods Mol. Biol.* **2006**, *322*, 435–443.
- [85] A. W. Murray, *Methods Cell Biol.* **1991**, *36*, 581–605.
- [86] P. Selenko, D. P. Frueh, S. J. Elsaesser, W. Haas, S. P. Gygi, G. Wagner, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 321–329.
- [87] J. F. Bodart, J. M. Wieruszkeski, L. Amniai, A. Leroy, I. Landrieu, A. Rousseau-Lescuyer, J. P. Vilain, G. Lippens, *J. Magn. Reson.* **2008**, *192*, 252–257.
- [88] R. Hänsel, F. Löhr, S. Foldynova-Trantirkova, E. Bamberg, L. Trantirek, V. Dötsch, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 5768–5775.
- [89] A. T. Phan, *FEBS J.* **2010**, *277*, 1107–1117.
- [90] B. Heddi, A. T. Phan, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9824–9833.
- [91] J. Dai, M. Carver, D. Yang, *Biochimie* **2008**, *90*, 1172–1183.
- [92] K. W. Lim, V. C. M. Ng, N. Martín-Pintado, B. Heddi, A. T. Phan, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 10556–10562.
- [93] G. N. Parkinson, M. P. Lee, S. Neidle, *Nature* **2002**, *417*, 876–880.
- [94] J. Danielsson, K. Inomata, S. Murayama, H. Tochio, L. Lang, M. Shirakawa, M. Oliveberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10266–10269.
- [95] N. Shimba, Z. Serber, R. Ledwidge, S. M. Miller, C. S. Craik, V. Dötsch, *Biochemistry* **2003**, *42*, 9227–9234.
- [96] S. Bhakdi, U. Weller, I. Walev, E. Martin, D. Jonas, M. Palmer, *Med. Microbiol. Immunol.* **1993**, *182*, 167–175.
- [97] T. Nakanishi, M. Miyazawa, M. Sakakura, H. Terasawa, H. Takahashi, I. Shimada, *J. Mol. Biol.* **2002**, *318*, 245–249.
- [98] L. Banci, L. Barbieri, I. Bertini, E. Luchinat, E. Secci, Y. Zhao, A. R. Aricescu, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 297–299.
- [99] L. Banci, L. Barbieri, I. Bertini, F. Cantini, E. Luchinat, *PLoS One* **2011**, *6*, e23561.
- [100] R. Ward, A. Bowman, E. Sozudogru, H. El-Mkami, T. Owen-Hughes, D. G. Norman, *J. Magn. Reson.* **2010**, *207*, 164–167.
- [101] M. Azarkh, O. Okle, P. Eyring, D. R. Dietrich, M. Drescher, *J. Magn. Reson.* **2011**, *212*, 450–454.
- [102] B. Bekei, H. M. Rose, M. Herzig, H. Stephanowitz, E. Krause, P. Selenko, *Methods Mol. Biol.* **2012**, *895*, 67–83.
- [103] B. Bekei, H. M. Rose, M. Herzig, P. Selenko, *Methods Mol. Biol.* **2012**, *895*, 55–66.
- [104] B. Bekei, H. M. Rose, M. Herzig, A. Dose, D. Schwarzer, P. Selenko, *Methods Mol. Biol.* **2012**, *895*, 43–54.
- [105] R. Thongwichian, P. Selenko, *Methods Mol. Biol.* **2012**, *895*, 33–41.
- [106] T. Maly, G. T. Debelouchina, V. S. Bajaj, K. N. Hu, C. G. Joo, M. L. Mak-Jurkauskas, J. R. Sirigiri, P. C. van der Wel, J. Herzfeld, R. J. Temkin, R. G. Griffin, *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 052211.
- [107] M. Renault, S. Pawsey, M. P. Bos, E. J. Koers, D. Nand, R. Tommassen-van Boxtel, M. Rosay, J. Tommassen, W. E. Maas, M. Baldus, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 3053–3056; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2998–3001.
- [108] D. J. Chin, G. A. Green, G. Zon, F. C. Szoka, Jr., R. M. Straubinger, *New Biol.* **1990**, *2*, 1091–1100.
- [109] T. L. Fisher, T. Terhorst, X. Cao, R. W. Wagner, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 3857–3865.
- [110] J. P. Leonetti, N. Mechtii, G. Degols, C. Gagnor, B. Lebleu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 2702–2706.
- [111] D. S. Hembram, T. Haremaki, J. Hamatsu, J. Inoue, H. Kamoshida, T. Ikeya, M. Mishima, T. Mikawa, N. Hayashi, M. Shirakawa, Y. Ito, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *438*, 653–659.
- [112] S. Liokatis, A. Dose, D. Schwarzer, P. Selenko, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14704–14705.
- [113] A. Dose, S. Liokatis, F. X. Theillet, P. Selenko, D. Schwarzer, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 419–424.
- [114] H. M. Rose, M. Stuiiver, R. Thongwichian, F. X. Theillet, S. M. Feller, P. Selenko, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2013**, *1834*, 1396–1401.
- [115] F. X. Theillet, H. M. Rose, S. Liokatis, A. Binolfi, R. Thongwichian, M. Stuiiver, P. Selenko, *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 1416–1432.