

Festkörper-NMR-Studien an der Membrananker-Domäne von YadA in der bakteriellen Außenmembran

Shakeel A. Shahid, Madhu Nagaraj, Nandini Chauhan, Trent W. Franks, Benjamin Bardiaux, Michael Habeck, Marcella Orwick-Rydmark, Dirk Linke* und Barth-J. van Rossum*

Abstract: MAS-NMR-Spektroskopie wurde verwendet, um die Struktur und Dynamik der Membrananker-Domäne von YadA (YadA-M) direkt in der bakteriellen Außenmembran zu untersuchen, in der das Protein exprimiert wurde. YadA ist ein Adhäsin des Pathogens *Yersinia enterocolitica*, das an Interaktionen mit Wirtszellen beteiligt ist und darüber hinaus auch als Modellprotein zu Studien des Autotransportprozesses dient. Mithilfe von ^{13}C - ^{13}C -DARR- und PDSD-Spektren bei unterschiedlichen Mischzeiten konnten wir existierende chemische Verschiebungen für einen weiten Bereich von YadA-M in der Lipidmembran übertragen. Die chemischen Verschiebungen von YadA-M waren in den meisten Regionen im Vergleich zu denen in mikrokristallinen Präparationen, auf deren Basis bereits eine Struktur gelöst wurde, unverändert. Das trifft insbesondere auf die ASSA-Region zu, die vermutlich als Übergangszustand während des Transports der löslichen Domäne eine Haarnadelstruktur einnimmt. Vergleiche der Dynamik zwischen mikrokristallinen und in der Membran eingebetteten Proben zeigen eine höhere Flexibilität der ASSA-Region in den Außenmembran-Präparationen bei physiologischen Temperaturen. Diese Studie wird den Weg für die MAS-NMR-basierte Strukturberechnung von Membranproteinen und für ein besseres Verständnis der Funktion von dynamischen Proteinbereichen in nativen Membranen bereiten.

Adhäsion an Wirtsgewebe ist der erste Schritt im Verlauf der meisten Infektionen, und Bakterien haben zu diesem Zweck eine ganze Reihe von Adhäsinen entwickelt.^[1] Die trimeren Autotransporter-Adhäsine (TAAs)^[2] sind eine Untergruppe der Typ-V-Sekretionssysteme,^[3] welche einen einzigartigen Transportmechanismus, den Autotransport, verwenden. *Yersinia*-Adhäsin A (YadA) ist der Prototyp der TAA-Familie und bildet wie alle anderen Proteine dieser Gruppe eine stabile, trimere Pore in der bakteriellen Außenmembran (AM), die als Translokationspore für die extrazelluläre, adhäsive Domäne dient.^[4] Diese die Membran durchspannende β -Fass-Domäne ist die einzige komplett konservierte Domäne der TAA-Familie und ist allein ausreichend für den Autotransportmechanismus.^[5]

Die Struktur und Funktion von Membranproteinen wird durch Interaktionen mit anderen Molekülen in ihrer Umgebung beeinflusst.^[6] Üblicherweise werden Membranproteine in künstlichen Proteoliposomen untersucht, die eine näherungsweise natürliche Umgebung darstellen, auch um hohe Auflösung und Empfindlichkeit in Festkörper-NMR-Spektren zu erreichen.^[7] Allerdings sind solche Präparationen oft aufwendig und zeigen nicht die asymmetrischen Eigenschaften der AM Gram-negativer Bakterien, deren äußere Schicht aus Lipopolysacchariden zusammengesetzt ist, die innere dagegen aus Phospholipiden. Nur wenige Festkörper-MAS-NMR-Studien wurden bisher in nativen Membranen durchgeführt.^[8]

Die ursprüngliche Festkörper-NMR-Struktur wurde mithilfe einer mikrokristallinen Probe gelöst, wobei ein Sequenzbereich von vier Resten (Ala, Ser, Ser, Ala) in der Translokationsdomäne gefunden wurde, der extrem flexibel zu sein scheint – basierend auf seinen nicht-helikalen chemischen Verschiebungen, reduzierten dipolaren Kopplungen und einer starken bioinformatischen Vorhersage für eine ungeordnete Struktur.^[9] Diese ASSA-Region bildet vermutlich das kurzlebige Haarnadel-Intermediat während des Autotransportprozesses, das inzwischen als bestes Modell für den Autotransport gilt.^[3, 9b]

In der vorliegenden Studie wollten wir die Struktur und Dynamik von YadA-M direkt in der *E. coli*-AM – ohne weitere Aufreinigung – untersuchen und dadurch mögliche Unterschiede zwischen beiden Proben aufdecken, weil verschiedene Untersuchungen an einer Reihe von Proteinen strukturelle Unterschiede gezeigt haben, die von der Lipid- oder Detergensumgebung abhängen.^[10] Darüber hinaus präsentieren wir eine partielle Zuordnung der chemischen Verschiebungen von YadA-M, liefern einfache Strategien zur Unterscheidung von Protein- und Lipidsignalen und geben wichtige Einblicke in die Dynamik dieser Proteindomäne in

[*] Dr. S. A. Shahid, Prof. D. Linke
Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Department 1
Tübingen (Deutschland)
Dr. S. A. Shahid, Dr. M. Nagaraj, Dr. T. W. Franks,
Dr. B.-J. van Rossum
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie FMP
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)
E-Mail: brossum@fmp-berlin.de
N. Chauhan, Dr. M. Orwick-Rydmark, Prof. D. Linke
University of Oslo, Department of Biosciences
POBox 1066 Blindern, 0316 Oslo (Norwegen)
E-Mail: dirk.linke@ibv.uio.no
Dr. B. Bardiaux
Unité de Bioinformatique Structurale, CNRS UMR3528
Institut Pasteur, Paris (Frankreich)
Dr. M. Habeck
Felix-Bernstein-Institut für Mathematische Statistik
Georg-August-Universität Göttingen (Deutschland)
und
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie
Göttingen (Deutschland)
Hintergrundinformationen und ORCIDs der Autoren zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201505506> zu finden.

der Lipiddoppelschicht. Obwohl wir keine drastischen strukturellen Unterschiede zwischen mikrokristallinem YadA-M und YadA-M in der Membran beobachten, verschwinden die Kristallkontakte. Außerdem zeigen wir, dass die funktionell wichtige ASSA-Region in Membranen flexibler ist als in der mikrokristallinen Probe. Unsere Studie demonstriert, dass sich in die Membran eingebettete, nicht weiter aufgereinigte, selektiv markierte Proteine direkt für MAS-NMR-Messungen zur Bestimmung von Struktur und Funktion unter physiologischen Bedingungen eignen.

Für die Herstellung unserer einheitlich bzw. selektiv markierten Festkörper-NMR-Proben haben wir eine vergleichsweise einfache Strategie verwendet: Nach der Proteinexpression wurden die bakteriellen Außenmembranen mittels mehrerer Zentrifugationsschritte isoliert und direkt in die NMR-Rotoren überführt. Die Details der Probenpräparation sind in den Hintergrundinformationen beschrieben. Wir schätzen die Proteinmenge in den Rotoren auf etwa 10 mg bei 70% Reinheit (5–7 mg YadA-M), in einem Pellet mit etwa 50 mg Feuchtgewicht. Im Gegensatz zu früheren Studien an Membranproteinen in Membranfragmenten mittels Festkörper-NMR^[11] messen wir unter physiologischen Bedingungen (Raumtemperatur), wodurch essentielle Informationen über die Proteindynamik erhalten bleiben. Diese Methode sollte direkt auf andere Membranproteine übertragbar sein, die in der *E. coli*-Außenmembran exprimiert werden können.

Die Aminosäuren Gly, Val, Ala und Ser (GVAS) sind in allen drei Sekundärstrukturelementen von YadA-M enthalten.^[9b] Insbesondere wird die ASSA-Region durch dieses Markierungsschema abgedeckt (siehe Hintergrundinformationen, Abbildung S1). Durch den hohen Anteil an YadA-M in der Membranprobe (70% laut SDS-PAGE-Gel) erhalten wir deutlich stärkere NMR-Signale von YadA-M als von anderen in der Probe vorhandenen Außenmembranproteinen (Abbildung S2).

Für eine eindeutige Zuordnung von YadA-M ist es entscheidend, zwischen Lipid- und Proteinsignalen unterscheiden zu können; hierzu verfolgten wir drei Ansätze. 1) Ein Vergleich von 1D-¹H-¹³C-Spektren von YadA-M in mikrokristalliner und Membranumgebung gibt gute Hinweise auf die chemischen Verschiebungen der Lipide (Abbildung 1A und Anhang S3), da sich die Lipidsignale sowohl in ihrer Intensität als auch in den numerischen Werten deutlich von denen des Proteins unterscheiden. Insbesondere erscheinen zusätzliche Signale im Bereich 65–110 ppm, die eindeutig den Lipiden zugeordnet werden können. 2) Da die einheitlich ¹³C-markierten und die GVAS-Proben von YadA-M unter denselben Bedingungen hergestellt wurden, sollten die enthaltenen Lipide vergleichbare Kreuzsignale in beiden Proben zeigen, was deren Identifizierung durch Vergleich der beiden Spektren ermöglicht. Als Beispiel zeigt eine Überlagerung der Spektren der selektiv und einheitlich ¹³C-markierten Proben (Abbildung 1B und Anhang S4), dass in der einheit-

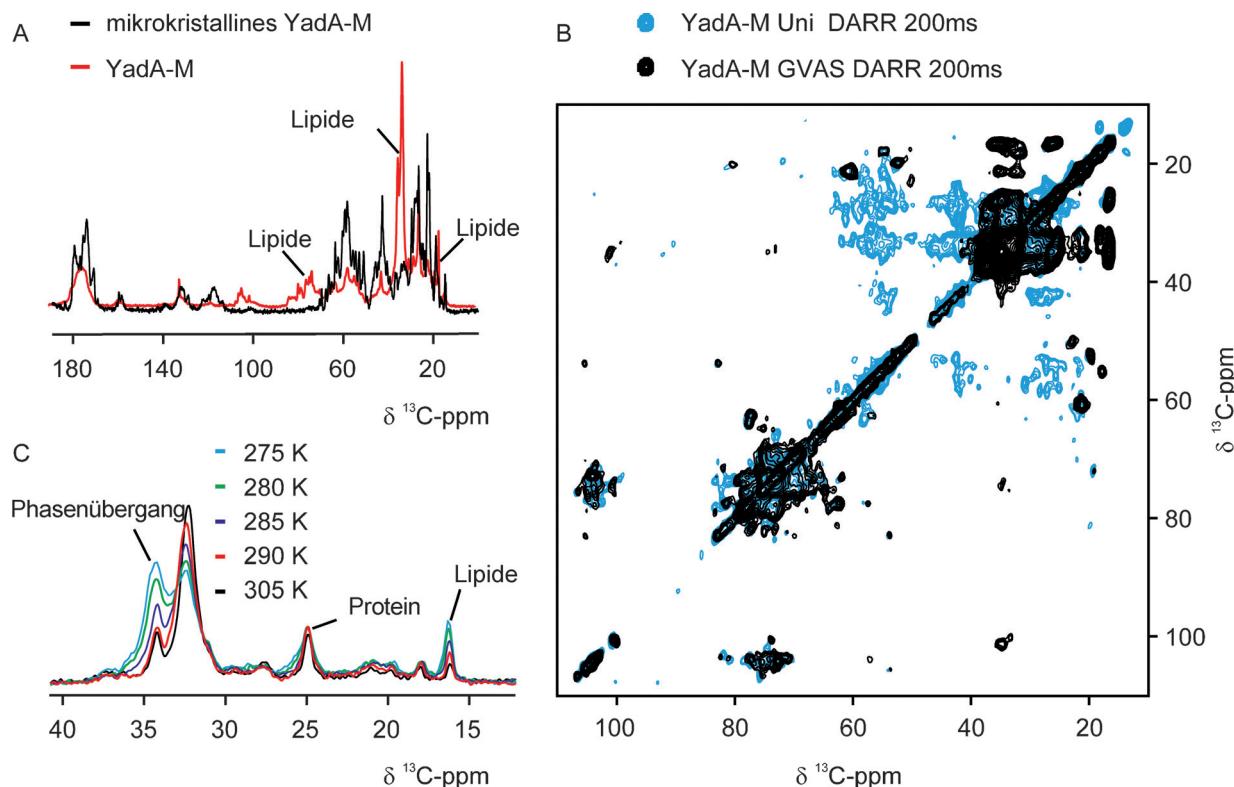


Abbildung 1. A) 1D-Spektren von einer einheitlich markierten, mikrokristallinen YadA-M Probe (schwarz) und einer einheitlich markierten Probe in der AM (rot). B) Überlagerung von 2D-Korrelationsspektren einer GVAS-Probe (schwarz) und einer einheitlich markierten Probe (türkis) in der AM, aufgenommen mit DARR („dipolar assisted rotational resonance“) bei 200 ms Mischzeit. Durch den Vergleich der Spektren können die Lipidsignale identifiziert werden. C) Eindimensionale ¹H-¹³C-CP-MAS-Spektren von GVAS-markiertem YadA-M bei unterschiedlichen Temperaturen, aus denen Phasenübergänge der Lipide abgeleitet werden können.

lich markierten Probe eine Reihe zusätzlicher Signale im Bereich 40–62 ppm auftaucht, die eindeutig YadA-M zugewiesen werden können. Signale in der aliphatischen Region (25–35 ppm, 43–60 ppm) und der Carbonyl-Region (170–180 ppm) überlappen stark zwischen den Spektren von mikrokristallinem und in der Membran eingebettetem YadA-M und sind daher ebenfalls eindeutig als Proteinsignale zu erkennen (Abbildung 2 und Abbildung S5). Die Region im

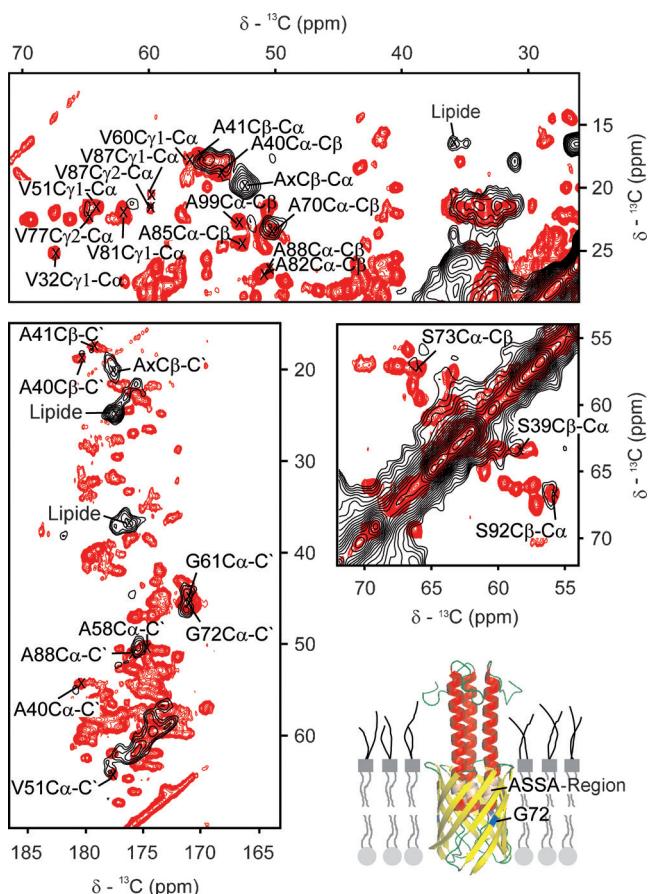


Abbildung 2. Zuordnung der chemischen Verschiebungen der GVAS-Probe. Gezeigt sind Spektren der einheitlich markierten mikrokristallinen Probe (rot) und der selektiv markierten GVAS-Probe in der bakteriellen Membran (schwarz). Beide Spektren wurden mit 25 ms DARR-Mischzeiten bei 275 K unter identischen Bedingungen gemessen. Unten rechts ist ein Modell der YadA-M-Struktur dargestellt (α -Helix rot, β -Faltblätter gelb, andere Bereiche grün). Der stark konservierte Rest G72 (grau) und die funktionell wichtige ASSA-Region (rosa) sind besonders hervorgehoben.

Bereich 25–40 ppm ist typisch für Lipidsignale, weshalb wir die Korrelationen in diesem Bereich wegen der starken Überlappung mit Proteinsignalen nicht zugeordnet haben. 3) Eine zusätzliche Hilfe bei der Zuordnung liefern die Phasenübergänge Lipid–Gel zu flüssiger Phase in den Membranproben.^[12] Die Lipidsignale zeigten extreme Veränderungen der Intensität bei veränderten Temperaturen, während die Proteinsignale praktisch unverändert blieben, sodass der Vergleich von 1D-Spektren bei verschiedenen Tempera-

turen zur Identifizierung der Lipidsignale herangezogen werden konnte (Abbildung 1 C).

Für die Zuordnung der chemischen Verschiebungen wurden zunächst Daten der GVAS-Probe verwendet. Viele Kreuzsignale der GVAS-Probe überlappten gut mit den Spektren von mikrokristallinem YadA-M (Abbildung 2), sodass eine Reihe von Zuordnungen direkt übernommen werden konnte. So zeigten z.B. die beiden aufeinanderfolgenden Alanine A40 und A41 in der α -Helix einfache zu erkennende Korrelationen sowohl in der aliphatischen als auch in der Carbonyl-Region, bei identischen chemischen Verschiebungen. Insgesamt schien es, als zeigten Reste, die nicht in direktem Kontakt mit der Lipiddoppelschicht standen, eine höhere Intensität – z.B. im Fall von A70 (Abbildung 2, oben rechts). Allerdings trifft dies nicht auf alle Reste zu, die ins Innere der Pore weisen, z.B. A82, A88, die nicht in den GVAS-Spektren erscheinen. Die meisten Valinreste zeigen zur Lipiddoppelschicht und weisen schwächere Signalintensitäten auf oder sind gar nicht sichtbar, vermutlich aufgrund ihrer hohen Dynamik.

Serinreste sind in YadA-M hauptsächlich im Bereich der flexibleren β -Schleifen angeordnet und zeigen ebenfalls keine starken Kreuzsignale. Eine Ausnahme stellt der Rest S73 dar, welcher der Membran zugewandt und direkt benachbart zum hoch konservierten Rest G72 in β -Strang 2 ist.^[5] Unsere früheren Studien an mikrokristallinem YadA-M haben gezeigt, dass dies einer der am wenigsten flexiblen Bereiche der Struktur mit sehr starken Sequenzkorrelationen ist – selbst bei kurzen Mischzeiten.^[9a] In den AM-Proben von YadA-M zeigt S73 jedoch deutlich schwächere Korrelationen, vermutlich aufgrund der hochdynamischen Lipidumgebung. Dies belegt auch, dass die Dynamik von YadA-M in der Membran generell erhöht ist.

Die Carbonyl-Region der Spektren zeigt eine Reihe von Kreuzsignalen für Alanin- und Glycinreste, insbesondere auch für den funktionell relevanten und hoch konservierten Rest G72, welcher sich dem Lumen der Pore zugewandt in β -Strang 2 befindet. Dieser Rest spielt eine wichtige Rolle beim Autotransportprozess; wird er durch Reste mit größeren Seitenketten ersetzt, verringert dies die Stabilität und die Transporteffizienz von YadA.^[5] Wie in den überlagerten Spektren zu sehen ist, verändern sich die chemischen Verschiebungen von YadA-M in der AM nicht. Dies gilt auch für Reste in der Umgebung der funktionell wichtigen ASSA-Region, wo A40 und A41 praktisch unveränderte chemische Verschiebungen in der aliphatischen und der Carbonyl-Region aufweisen. Dies belegt, dass die nicht-helikalen chemischen Verschiebungen der ASSA-Region wie vermutet eine Eigenschaft der nativen Struktur sind, und nicht ein Artefakt durch die Kristallisation von YadA-M in den ursprünglichen Proben.

Im nächsten Schritt wurden Spektren von einheitlich ^{13}C -markierten AM-Proben von YadA-M zu unterschiedlichen Mischzeiten aufgenommen, um Intra- und Inter-Aminosäure-Korrelationen zu erhalten (Abbildung 3, unten). Viele Reste konnten bei kurzen Mischzeiten aufgrund überlappender Signale nicht zugeordnet werden, wurden später aber durch sequenzielle Kontakte bei längeren Mischzeiten eindeutig bestimmt; als Beispiel dient der sequenzielle Kontakt zwi-

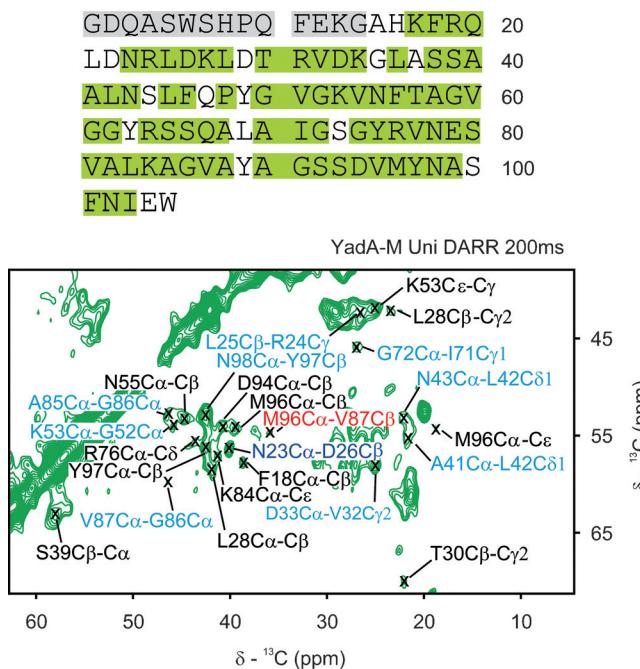


Abbildung 3. Oben: Die Primärsequenz von YadA-M ist für die Reste in grün gezeigt, die in den AM-Proben zugewiesen werden konnten (grau: Strep-Tag). Fast 75 % der zu beobachtenden Reste haben zumindest partielle Zuordnungen. Unten: Spektrum der einheitlich markierten YadA-M-Probe mit 200 ms DARR-Mischzeit; die Farbe der Korrelationen ist schwarz (innerhalb eines Restes), türkis (sequenziell), dunkelblau (mittlere Distanzen) und rot (lange Distanzen).

schen Y97 und N98, der durch eine Korrelation zwischen Y97C β und N98 α in 200 ms DARR-Mischung eindeutig zugeordnet werden konnte. Eine Reihe von Resten konnte in ähnlicher Weise systematisch auf Basis sequenzieller Rückgrat- und Seitenkettenkontakte zugeordnet werden.

Da Glycinreste keine Seitenketten besitzen, sind sie nur in einem schmalen Streifen von Korrelationen zwischen Carbonylgruppen und α -Kohlenstoffatomen zu finden, was eine Zurodnung erschwert. Dennoch konnten die meisten Glycinreste in YadA-M auf der Basis sequenzieller Kontakte in Spektren der einheitlich markierten Proben bei langen Mischzeiten eindeutig zugewiesen werden, z. B. G52, G72 und G86. Zusätzlich zu den sequenziellen Korrelationen konnten wir einen Kontakt zwischen den β -Strängen 3 und 4, namentlich M96C α -V87C β , zuweisen, der zeigt, dass die AM-Proben von YadA-M dasselbe Register der β -Stränge aufweisen wie in den mikrokristallinen Proben.

In der Festkörper-NMR-Struktur von mikrokristallinem YadA-M weist das trimere Protein hydrophobe Reste auf, die Kristallkontakte ausbilden; diese Kontakte sind direkt in den Festkörper-NMR-Daten sichtbar (Abbildung 4). So sind z. B. I71, I103 und mehrere Valinreste an Kristallkontakten beteiligt,^[9b,14] aber keiner dieser Reste zeigt diese Kreuzsignale in der AM-Probe von YadA-M.

Während die NMR-Messungen an Proben in der nativen AM in dieser Arbeit streng genommen keine trimere Struktur beweisen, wird durch vorhergehende Studien und durch SDS-PAGE-Gele (Anhang S2) klar belegt, dass YadA-M auch in der AM sehr stabile Trimere bildet.^[9b] TALOS +^[15] wurde für

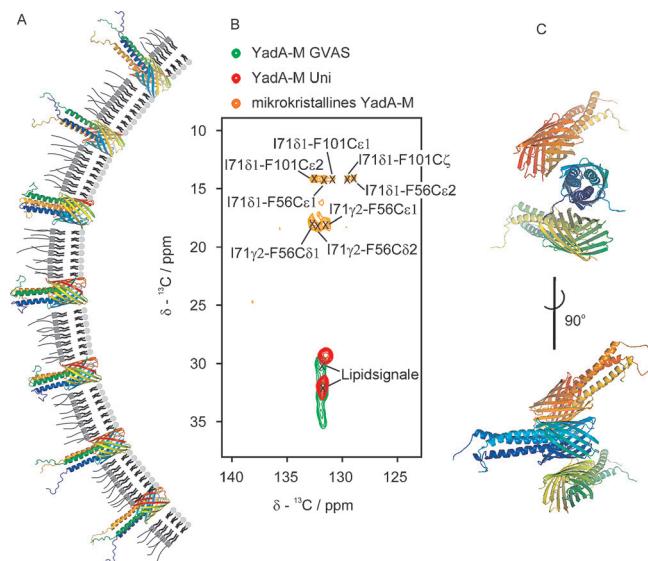


Abbildung 4. Die Kristallkontakte der mikrokristallinen Probe fehlen in der AM-Probe von YadA-M. A) Darstellung der Orientierung von YadA-M-Molekülen in der Lipiddoppelschicht. B) Zuordnung der Kristallkontakte durch Überlagerung von Spektren von mikrokristallinen und nativen AM-Proben. C) Kristallkontakte zwischen YadA-M-Trimeren, modelliert mit HADDOCK^[13] auf der Basis der Festkörper-NMR-Daten.

die Sekundärstrukturvorhersage und zur Berechnung des RCI („random coil index“) von YadA-M genutzt, auch wenn die TALOS-Vorhersagen aufgrund der fehlenden ^{15}N -chemischen Verschiebungen und ^{13}C -Rückgrat-Verschiebungen mit Vorsicht interpretiert werden müssen (Abbildung 5 und Abbildung S6). Eine höhere Dynamik in der Region L45–V51, die die Pore mit den darin liegenden Helices verbindet, wurde für die AM-Proben im Vergleich zu den mikrokristallinen Proben beobachtet (Abbildung 5). Darüber hinaus sind die vorhergesagten Ordnungsparameter in diesem Bereich sehr niedrig, was für eine größere Flexibilität dieses Bereichs in der AM-Probe von YadA-M spricht (Abbildung S7). Dies bestätigt auch unsere früheren Befunde über diesen Bereich des Proteins.^[16]

Wir hatten bereits zuvor eine hohe Flexibilität in ungeordneten bzw. nicht in klassischen Sekundärstrukturelementen eingebetteten Bereichen in mikrokristallinem YadA-M beobachtet.^[9b] Dem gegenüber sogar noch erhöhte RCI-Werte in der Region L45–V51 in der Membran deuten an, dass die Kristallisation von YadA-M die Dynamik bzw. die Freiheitsgrade dieser Region verringert. Dies ist ein interessanter Befund, vor allem da dieser Bereich sich im Inneren der Proteinpore befindet und damit nicht in direktem Kontakt mit der Lipiddoppelschicht steht. In gleicher Weise zeigt auch die ASSA-Region, die nach unserem Modell in TAAs eine intermediäre Haarnadelstruktur während des Autotransportprozesses annimmt, erhöhte RCI-Werte in AM-Proben von YadA-M.

Zusammenfassend haben wir gezeigt, dass die von uns zuvor bestimmte Struktur von YadA-M auf der Basis mikrokristalliner Proben in der Lipiddoppelschicht praktisch identisch bleibt, aber dass sich die Dynamik von Resten, die im Kontakt mit der Membran stehen, und von Resten in

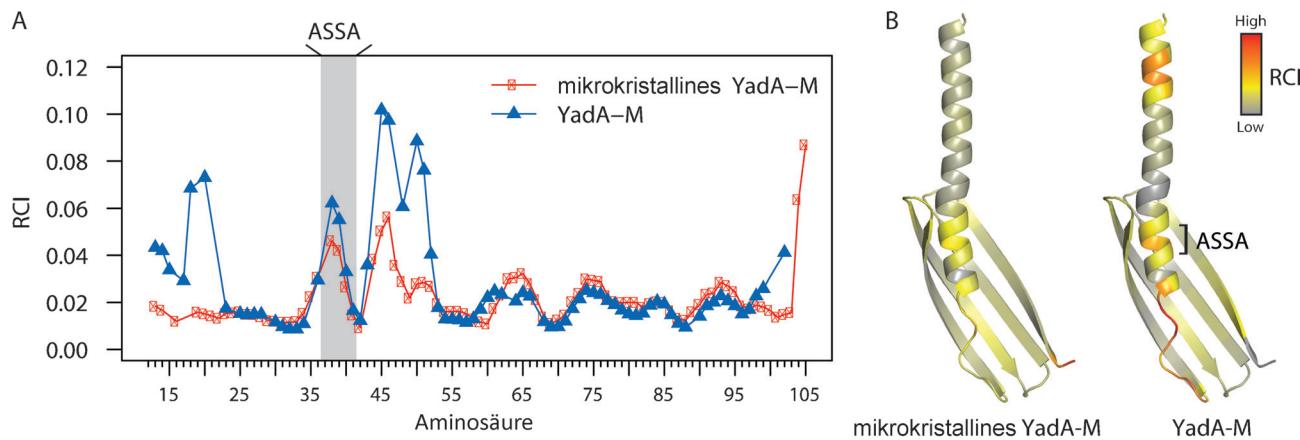


Abbildung 5. A) Vergleich von RCI-Werten (TALOS +) für YadA-M in Mikrokrystallinen und in der AM; in der AM zeigt die YadA-M-Probe mehrere Regionen mit erhöhter Flexibilität. B) Die Struktur eines YadA-M-Monomers, eingefärbt nach den RCI-Werten in mikrokrystalliner und Membranumgebung. Die ASSA-Region wird in beiden Strukturen als hoch flexibel vorhergesagt; dies ist aber noch prominenter in der Membranpräparation.

unstrukturierten Bereichen des Proteins in der AM deutlich erhöht. Die NMR-Signale zeigen aufgrund der deutlich heterogenen Umgebung in der Lipidmembran insgesamt eine schlechtere Auflösung, was die Zuordnung von chemischen Verschiebungen erschwert. Obwohl Protonen-Festkörper-NMR im Prinzip ebenfalls für hochauflösende Studien dieser Art verwendet werden kann, haben wir diese Strategie nicht genutzt, da der NMR-Austausch durch das Proteinrückgrat in Membransystemen deutlich ineffizienter sein kann.^[17] Dennoch war es uns möglich, mithilfe einer Kombination von selektiv und einheitlich markierten Proben intra- und intermolekulare Korrelationen zuzuordnen und biologisch relevante Dynamik, die oft direkt an die Funktion von Proteinen gekoppelt ist, zu messen – direkt in der nativen Membran. Wir sind überzeugt, dass diese Arbeit die Machbarkeit von hochauflösenden Struktur- und Funktionsstudien an Proteinen in ihrer nativen Umgebung und bei physiologischen Temperaturen belegt.

Danksagung

Wir danken Andrei Lupas und Hartmut Oschkinat für ihre langfristige Unterstützung, Anne Diehl für Hilfe mit den Markierungsstrategien und Andrew Nieuwkoop für hilfreiche Diskussionsbeiträge. Diese Arbeit wurde durch Zuwendungen vom Programm „Methoden für die Lebenswissenschaften“ der Baden-Württemberg-Stiftung an D.L. und M.H. unterstützt. Die NMR-Daten dieser Arbeit wurden in der BMRB-Datenbank hinterlegt (Eintrag 26606).

Stichwörter: Autotransport · Festkörper-NMR-Spektroskopie · Membranproteine · Strukturbiologie · *Yersinia*-Adhäsin A

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 12602–12606
Angew. Chem. **2015**, *127*, 12792–12797

[1] H. H. Niemann, W. D. Schubert, D. W. Heinz, *Microbes Infect.* **2004**, *6*, 101–112.

- [2] D. Linke, T. Riess, I. B. Autenrieth, A. Lupas, V. A. Kempf, *Trends Microbiol.* **2006**, *14*, 264–270.
- [3] J. C. Leo, I. Grin, D. Linke, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **2012**, *367*, 1088–1101.
- [4] C. J. Oomen, P. van Ulsen, P. van Gelder, M. Feijen, J. Tommassen, P. Gros, *EMBO J.* **2004**, *23*, 1257–1266.
- [5] U. Grosskinsky, M. Schutz, M. Fritz, Y. Schmid, M. C. Lamparter, P. Szczesny, A. N. Lupas, I. B. Autenrieth, D. Linke, *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 9011–9019.
- [6] a) K. Sackett, M. J. Nethercott, Z. Zheng, D. P. Weliky, *J. Mol. Biol.* **2014**, *426*, 1077–1094; b) S. O. Smith, *Annu. Rev. Biophys.* **2010**, *39*, 309–328; c) M. Weingarth, M. Baldus, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2037–2046.
- [7] a) T. Sinnige, M. Weingarth, M. Renault, L. Baker, J. Tommassen, M. Baldus, *J. Mol. Biol.* **2014**, *426*, 2009–2021; b) M. Renault, M. P. Bos, J. Tommassen, M. Baldus, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4175–4177; c) M. T. Eddy, Y. Su, R. Silvers, L. Andreas, L. Clark, G. Wagner, G. Pintacuda, L. Emsley, R. G. Griffin, *J. Biomol. NMR* **2015**, *61*, 299–310.
- [8] a) M. Renault, R. Tommassen-van Boxtel, M. P. Bos, J. A. Post, J. Tommassen, M. Baldus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 4863–4868; b) V. A. Higman, K. Varga, L. Aslimovska, P. J. Judge, L. J. Sperling, C. M. Rienstra, A. Watts, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8432–8435; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 8583–8586; c) 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. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2998–3001; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 3053–3056; d) V. S. Bajaj, M. L. Mak-Jurkauskas, M. Belenky, J. Herzfeld, R. G. Griffin, *J. Magn. Reson.* **2010**, *202*, 9–13.
- [9] a) S. A. Shahid, S. Markovic, D. Linke, B. J. van Rossum, *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 803; b) S. A. Shahid, B. Bardiaux, W. T. Franks, L. Krabben, M. Habeck, B. J. van Rossum, D. Linke, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 1212–1217.
- [10] a) H. X. Zhou, T. A. Cross, *Annu. Rev. Biophys.* **2013**, *42*, 361–392; b) Y. Miao, H. Qin, R. Fu, M. Sharma, T. V. Can, I. Hung, S. Luca, P. L. Gor'kov, W. W. Brey, T. A. Cross, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8383–8386; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8508–8511.
- [11] T. Jacso, W. T. Franks, H. Rose, U. Fink, J. Broecker, S. Keller, H. Oschkinat, B. Reif, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 432–435; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 447–450.
- [12] a) D. Chapman, *Q. Rev. Biophys.* **1975**, *8*, 185–235; b) P. Oeverath, M. Brenner, T. Gulik-Krzywicki, E. Shechter, L. Letellier, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1975**, *389*, 358–369.

- [13] a) C. Dominguez, R. Boelens, A. M. Bonvin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1731–1737; b) S. J. de Vries, A. D. van Dijk, M. Krzeminski, M. van Dijk, A. Thureau, V. Hsu, T. Wassenaar, A. M. Bonvin, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2007**, *69*, 726–733.
- [14] S. A. Shahid, Dissertation, Freie Universität Berlin, **2012**.
- [15] Y. Shen, F. Delaglio, G. Cornilescu, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **2009**, *44*, 213–223.
- [16] S. A. Shahid, M. Habeck, D. Linke, B. J. van Rossum, *GIT Lab. J.* **2013**, *17*, 14–16.
- [17] a) R. Linser, M. Dasari, M. Hiller, V. Higman, U. Fink, J. M. Lopez del Amo, S. Markovic, L. Handel, B. Kessler, P. Schmieder, D. Oesterhelt, H. Oschkinat, B. Reif, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4508–4512; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4601–4605; b) M. E. Ward, L. Shi, E. Lake, S. Krishnamurthy, H. Hutchins, L. S. Brown, V. Ladizhansky, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17434–17443.

Eingegangen am 15. Juni 2015,
veränderte Fassung am 17. Juli 2015
Online veröffentlicht am 31. August 2015