

## NMR-Spektroskopie von Membranen

Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201606594  
Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201606594 **$^1\text{H}$ -detektierte Festkörper-NMR-Studien wasserunzugänglicher Proteine in vitro und in situ**

João Medeiros-Silva, Deni Mance, Mark Daniëls, Shehrazade Jekhmane, Klaartje Houben, Marc Baldus und Markus Weingarth\*

**Abstract:**  $^1\text{H}$ -Detektion kann die spektrale Empfindlichkeit in der Festkörper-NMR-Spektroskopie stark verbessern und erlaubt dadurch Studien komplexerer Proteine. Zur  $^1\text{H}$ -Detektion müssen jedoch austauschbare Wasserprotonen in ansonsten perdeuterierte Proteine eingeführt werden. Diese Vorbedingung hat bisweilen Studien wasserunzugänglicher Proteine stark erschwert. Hier präsentieren wir eine Methode, welche die hochaufgelöste  $^1\text{H}$ -Detektion wasserunzugänglicher Proteine ermöglicht und selbst in hochkomplexen Medien wie zellulären Oberflächen funktioniert. Wir demonstrieren unsere Methode am Beispiel des  $\text{K}^+$ -Kanals KcsA in Liposomen sowie in situ in nativen bakteriellen Zellmembranen. Wir verwenden unsere Daten für eine Analyse der KcsA-Dynamik und zeigen, dass der Selektivitätsfilter, der in  $\text{K}^+$ -Kanälen hochkonserviert vorliegt und kritisch für die Ionenleitfähigkeit ist, ausgeprägte molekulare Flexibilität aufweist.

**$^1\text{H}$** -Detektion kann die spektrale Empfindlichkeit in der Festkörper-NMR-Spektroskopie (ssNMR) stark verbessern und erlaubt dadurch Studien komplexerer Proteine.<sup>[1]</sup>  $^1\text{H}$ -detektierte ssNMR-Experimente benötigen gewöhnlich eine starke Verdünnung des  $^1\text{H}$ -Netzwerks, um linienverbreitende dipolare  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -Kopplungen zu vermindern. Dies kann durch Proteinexpression in deuterierten Lösungsmitteln erreicht werden.<sup>[2]</sup> Während hohe Deuterierungsgrade eine exzellente  $^1\text{H}$ -Resolution erlauben, benötigen sie allerdings einen  $^1\text{H}/^2\text{D}$ -Austauschschritt, um Aminoprotonen ( $\text{H}^{\text{N}}$ ) einzubauen. Daher bleiben wasserunzugängliche Proteinregionen mit diesen Deuterierungsmethoden unsichtbar für  $^1\text{H}$ -Detektion, es sei denn, dass Faltungs- und Rückfaltungsprotokolle verwendet werden. Diese sind aber mühsam, nicht allgemein anwendbar und auf In-vitro-Proteinproben beschränkt. Weiterhin sind deuterierte Lösungsmittel generell mit hohen Kosten verbunden, und sie können auch die Pro-

teinexpression reduzieren oder verhindern, besonders in Säugetierzellen. Vollprotonierte Proteine können hier Abhilfe schaffen,<sup>[3]</sup> allerdings bieten solche Systeme nur eine begrenzte spektrale Auflösung. Selbst bei sehr hohen MAS-Frequenzen ( $>100\text{ kHz}$ )<sup>[4]</sup> ist die Auflösung in vollprotonierten Proben durch residuale  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -Kopplungen bestimmt und somit verbesserbar. Weiterhin erfordert 100-kHz-MAS winzige Probenvolumina, und der resultierende Empfindlichkeitsverlust ist für heterogene Systeme, wie z. B. In-situ-Proben, nur schwierig zu kompensieren.

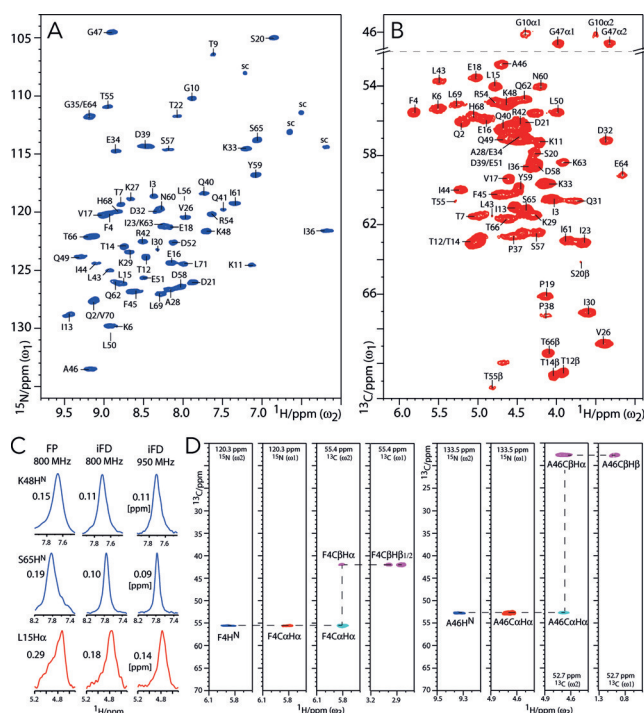
Die oben erwähnten Aspekte haben bisher die Anwendung von  $^1\text{H}$ -Detektion in wasserunzugänglichen Proteinregionen drastisch limitiert. Dies ist ein großes Problem für die ssNMR-Spektroskopie, da z. B. Bindungstaschen und aktive Zentren tief im Inneren von Proteinen eingebettet sein können. Es ist insbesondere eine kritische Einschränkung für Membranproteine, deren transmembrane Domänen funktional sehr bedeutsam sind und nicht in protonierten Puffern austauschen.<sup>[2c,3c,5]</sup> Basierend auf diesen Überlegungen haben wir eine zweistufige Methode entwickelt, die in vitro und in situ anwendbar ist, bereits bei moderaten MAS-Frequenzen von 60 kHz funktioniert und hochaufgelöste  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wasserunzugänglicher Proteinregionen ermöglicht. Im ersten Schritt verbessern wir die  $^1\text{H}$ -Auflösung durch ein neues Markierungsschema – inverse fraktionale Deuterierung (iFD) –, das auf protonierten Lösungsmitteln (100 %  $\text{H}_2\text{O}$ ) und volldeuterierter  $^{13}\text{C}$ -Glukose im Wachstumsmedium basiert. Im zweiten Schritt inkubieren wir iFD-markierte Proteine in deuterierten Puffern (100 %  $\text{D}_2\text{O}$ ), was die spektrale Auflösung weiter deutlich verbessert. Die iFD-Markierung wurde mittels Ubiquitin eingeführt und anschließend in Kombination mit  $\text{D}_2\text{O}$ -Inkubation verwendet, um den transmembranen (TM) Abschnitt des Ionenkanals KcsA in Liposomen zuzuordnen. Auf der Basis unserer Zuordnungen präsentieren wir eine hochaufgelöste Studie der Dynamik des TM-Abschnitts. Dies ist wichtig für ein umfassendes Verständnis von Ionenkanal-Gating. Bemerkenswerterweise bietet unsere Methode sogar eine hinreichende Empfindlichkeit für die Aufnahme qualitativ hochwertiger Spektren von Membranproteinen in situ, d. h. direkt in nativen bakteriellen Zellmembranen.

iFD-Markierung ist der erste von zwei aufeinanderfolgenden Schritten zur Verbesserung der Auflösung wasserunzugänglicher  $^1\text{H}$ -Kerne, besonders von  $\text{H}^{\text{N}}$  und  $\text{H}^{\alpha}$ , die am wichtigsten für Rückgrat-Zuordnungen sind. Abbildungen 1 A, B zeigen  $^1\text{H}$ -detektierte 2D-NH- und 2D-CH-Spektren von iFD- $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -Ubiquitin in wässrigen Puffern (100 %  $\text{H}_2\text{O}$ ), gemessen bei 950 MHz  $^1\text{H}$ -Frequenz und mit 60 kHz MAS sowie MISSISSIPPI Lösungsmittelunterdrückung<sup>[7]</sup> und

[\*] J. Medeiros-Silva, D. Mance, M. Daniëls, S. Jekhmane, Dr. K. Houben, Prof. M. Baldus, Dr. M. Weingarth  
NMR Spectroscopy, Bijvoet Center for Biomolecular Research  
Department of Chemistry, Utrecht University  
Pandualaan 8, 3584 CH Utrecht (Niederlande)  
E-Mail: M.H.Weingarth@uu.nl

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind unter:  
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.201606594> zu finden.

© 2016 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, die eine Nutzung und Verbreitung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird und keine Änderungen und Anpassungen vorgenommen werden.



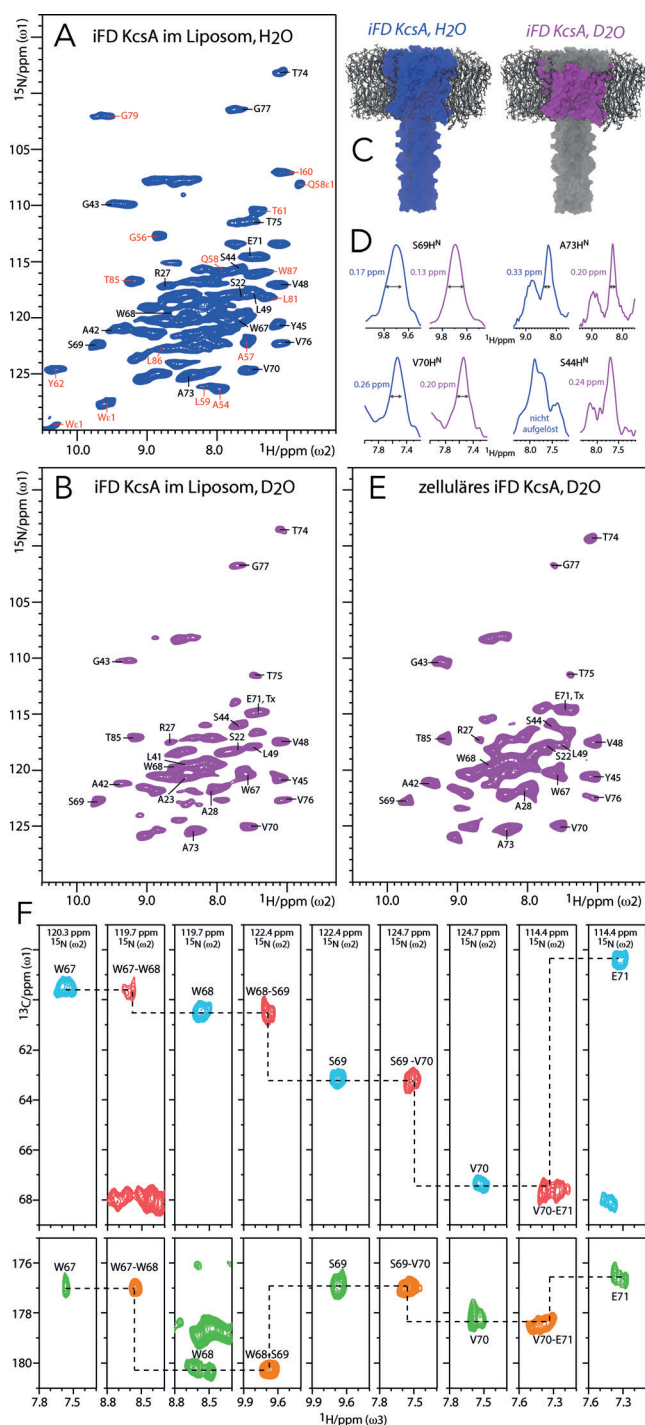
**Abbildung 1.** Dipolare  $^1\text{H}$ -detektierte ssNMR-Experimente in invers fraktionell deuteriertem (iFD) Ubiquitin, gemessen bei 950 MHz und 60 kHz MAS. A) 2D-NH-Spektrum (blau). B) CaHa-Region eines 2D-CH-Spektrums (rot). C)  $t_1$ -Querschnitte, extrahiert aus 2D-NH- (blau) und CH-Spektren (rot) von vollprotoniertem (FP) und iFD-Ubiquitin. D)  $^1\text{H}$ -detektierte Seitenkettenzuordnungen. Strip-Plots von 3D-CaNH- (blau), 3D-NCaHa- (rot) und 3D-CCH-Experimenten (cyan für negative und violett für positive Signale). DREAM<sup>[6]</sup>  $^{13}\text{C}$ -Transfer wurde für das 3D-CCH-Experiment benutzt.

PISSARRO-Entkopplung.<sup>[8]</sup> Die Spektren sind sehr gut aufgelöst und zeigen eine durchschnittliche Linienbreite von 0.1–0.2 ppm für  $\text{H}^{\text{N}}$  und Ha bei 950 MHz. Dieser Wert ist exzellent in Anbetracht der hohen  $^1\text{H}$ -Dichte von 80 % in iFD-Proteinen und bedeutet eine substantielle Verbesserung von 30–35 % verglichen zu vollprotoniertem Ubiquitin (Abbildung 1C und Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen; siehe auch Sektion S2 für eine quantitative  $^1\text{H}$ -Populationsanalyse und eine Diskussion der  $^1\text{H}$ -Linienbreitenverbesserung). Zudem sind die  $^1\text{H}$ -Level von sowohl Ha als auch  $\text{H}^{\text{N}}$  dicht bei 100 % in iFD-Ubiquitin, da beide aus dem protonierten Lösungsmittel rekrutiert werden. Wir beobachten auch eine sehr gute Auflösung von ca. 0.1 ppm für viele Seitenketten- $^1\text{H}$  (Abbildung S3), auch wenn die Auflösung mancher Methylgruppen durch Isotopologeneffekte beeinträchtigt ist. Folglich können viele Rückgrat- und Seitenketten- $^1\text{H}$  in iFD-Ubiquitin problemlos zugeordnet werden (Abbildung 1D). Wir korrelierten erst Rückgrat- $\text{H}^{\text{N}}$ , die bereits zugeordnet waren,<sup>[2f]</sup> mit Ha durch 3D-CaNH- und 3D-NCaHa-Experimente. Danach nutzten wir ein 3D-CCH-Experiment, um Seitenketten- $^1\text{H}$  zu detektieren, die dann mit den Rückgrat- $^1\text{H}$  verknüpft wurden (siehe Hintergrundinformation für experimentelle Details).

Um die  $^1\text{H}$ -Auflösung wasserunzugänglicher Proteinregionen weiter zu verbessern, kombinierten wir iFD-Markierung mit  $\text{D}_2\text{O}$ -Inkubation. Wir zeigen dies am Beispiel des

Kaliumkanals KcsA, einem geläufigen Modell für Ionenkanal-Gating.<sup>[9]</sup> Abbildung 2A zeigt ein 2D-NH-Spektrum von iFD- $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -markiertem KcsA, rekonstituiert in *E. coli*-Lipiden und protoniertem Puffer, gemessen bei 60 kHz MAS und 800 MHz. Dieses Spektrum zeigt  $\text{H}^{\text{N}}$ -Signale des gesamten Kanals, ist bereits von ansprechender Auflösung verglichen mit unseren vorherigen Resultaten mit vollprotoniertem KcsA<sup>[3c]</sup> und erlaubt ohne weiteres die Identifizierung von bereits zugeordneten wasserzugänglichen Signalen (rot, Abbildung 2A).<sup>[2f]</sup> Um ausschließlich den TM-Teil zu selektieren, inkubierten wir iFD-KcsA in  $\text{D}_2\text{O}$  und nahmen ein 2D-NH-Spektrum auf, das eine starke Verbesserung der spektralen Qualität zeigte, mit teilweise exzellenten Linienbreiten von 0.13 ppm (Abbildungen 2B,C). Die verbesserte Auflösung ist teilweise bedingt durch das nahezu komplette Verschwinden von wasserexponierten  $\text{H}^{\text{N}}$ , was die Signalüberlagerung reduziert (siehe Abbildung S4). Bemerkenswerterweise verbessert die Entfernung von Wasserprotonen (und anderer austauschbarer  $^1\text{H}$  auch die Linienbreite aller TM- $\text{H}^{\text{N}}$  um 25 % im Vergleich zu Spektrum 2A (Abbildung 2D und Tabelle S5). Diese Beobachtung bedeutet, dass residuale Kopplungen zu Wasserprotonen zur  $^1\text{H}$ -Linienbreite beitragen, und das selbst in hochprotonierten Membranproteinen bei 60 kHz MAS und 35 °C Proben temperatur. Solche Restkopplungen sind vermutlich ausgeprägt in KcsA aufgrund von strukturellem Wasser und einer großen, wassergefüllten transmembranen Kammer.<sup>[3c]</sup>

Die spektrale Qualität, die unser zweistufiger Ansatz gewährt, ermöglicht die Messung des TM-Abschnitts direkt in einer nativen Zellmembran.<sup>[10]</sup> Zellmembranen sind viel komplexer als Liposomen, was die Lipid- und Proteinzusammensetzung angeht, und diese Komplexität kann die Funktion von Membranproteinen beeinflussen. Allerdings sind zelluläre ssNMR-Messungen sehr kompliziert aufgrund der geringen Konzentration der Zielproteine. Zelluläres KcsA wurde in der inneren Membran von *E. coli* mithilfe der Rifampicin-Methode exprimiert, um den endogenen spektralen Hintergrund zu reduzieren.<sup>[11]</sup> Die äußere Membran wurde entfernt, um die KcsA-Konzentration zu erhöhen. Vor den ssNMR-Messungen wurde die Probe drei Tage in deuteriertem Lösungsmittel inkubiert. Wir erhielten ein überraschend gut aufgelöstes In-situ-2D-NH-Spektrum (Abbildung 2E), das einen klaren Fingerabdruck des geschlossen-leitfähigen KcsA zeigte,<sup>[9c]</sup> ohne unerwünschte Signale anderer Proteine (Abbildung S6). Dies ist bemerkenswert, da die KcsA-Konzentration in situ etwa 7-mal geringer war als in vitro (Abbildung S10). Wir konnten leicht die In-situ-Signale anhand unserer In-vitro-Daten zuordnen (siehe unten). Unseres Wissens ist dies das erste Mal, dass einige wenige Nanomol eines Membranproteins (ca. 3 Nanomol oder 175  $\mu\text{g}$  KcsA) in situ mithilfe von  $^1\text{H}$ -ssNMR-Spektroskopie zugeordnet werden konnten. Zelluläres KcsA zeigte nur geringe Veränderungen in den chemischen Verschiebungen (CSPs) gegenüber In-vitro-KcsA (Abbildung S11), was impliziert, dass *E. coli*-Lipide gute Membranmimetika sind. Jedoch beobachten wir einige markante Differenzen, die wir weiter unten im Text diskutieren. Zusätzlich waren viele Signale im In-situ-Spektrum stark verbreitert (um bis 100 %; Abbildung S7), was auf die Heterogenität der zellulären Probe



**Abbildung 2.**  $^1\text{H}$ -Detektion wasserunzugänglicher Regionen von KcsA. Daten wurden bei 800 MHz und 60 kHz MAS gemessen. 2D-NH-Spektren von A) iFD-KcsA in Liposomen vor (blau) und B) nach  $\text{D}_2\text{O}$ -Inkubation (violett) sowie E) von zellulärem  $\text{D}_2\text{O}$ -inkubiertem iFD-KcsA, gemessen in nativen Zellmembranen (violett). Zuordnungen in rot stammen von FD-KcsA,<sup>[2f]</sup> Zuordnungen in schwarz von iFD-KcsA. C) Farbkodierung von Regionen, die detektierbare  $\text{H}^{\text{N}}$  enthalten. Alle  $\text{H}^{\text{N}}$  sind präsent in iFD-KcsA, während nur der TM-Abschnitt nach  $\text{D}_2\text{O}$ -Inkubation übrigbleibt. D)  $t_1$ -Querschnitte extrahiert aus 2D-NH-Spektren von iFD-KcsA vor (blau) und nach (violett)  $\text{D}_2\text{O}$ -Inkubation. F)  $^1\text{H}$ -detektierte Zuordnungen von Abschnitt W67–E71 der Porenhelix. Strip-Plots von 3D-CaNH- (cyan), Ca(CO)NH- (rot), CONH (orange) und CO-(Ca)NH-Experimenten (grün).

zurückzuführen ist. Man beachte, dass diese Art von Linienverbreiterung unabhängig von der MAS-Frequenz ist und somit wahrscheinlich die Empfindlichkeit beeinträchtigt, falls schmalere ( $< 1.3$  mm) Rotordurchmesser verwendet werden. Wir konnten ungefähr die Hälfte von Spektrum 2B zuordnen, basierend auf 3D-CaNH-, Ca(CO)NH-, CONH- und CO-(Ca)NH-Experimenten (Abbildung 2F), ergänzt durch 3D-NaCX- und 2D-N(CO)CX-Spektren und verfügbaren Daten  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -chemischer Verschiebungen.<sup>[9c,12]</sup> Diese Zuordnungen umfassen eine Reihe von funktionell essenziellen Elementen, die nun zum ersten Mal für die  $^1\text{H}$ -Detektion zugänglich sind.

Der Selektivitätsfilter, der für die strikte Selektion von  $\text{K}^+$ - gegenüber  $\text{Na}^+$ -Ionen verantwortlich ist, umfasst die charakteristische 75-TVGYG-79-Sequenz, die allen  $\text{K}^+$ -Kanälen gemein ist.<sup>[9a]</sup> Während wir lediglich die austauschbaren Aminosäuren Y78 und G79 vormals detektieren konnten,<sup>[2f]</sup> können wir nun auch den Rest des Filters T74–G77 zuordnen. Weiterhin konnten wir die Porenhelix L66–E71, die kritisch für C-Typ-Inaktivierung ist,<sup>[9a]</sup> sowie auch Teile der TM1-Helix L41–L49, die direkt dem lipidsensitiven Turret vorhergehen, zuordnen.<sup>[9c]</sup> Diese Signale konnten größtenteils in zellulärem KcsA wiedergefunden werden. Allerdings konnten wir nicht eindeutig Aminosäuren der TM2-Helix zuordnen, teilweise aufgrund spektraler Überlagerung. Unsere Daten suggerieren jedoch deutlich, dass Teile der TM2-Helix in  $\text{D}_2\text{O}$  austauschen, insbesondere Aminosäuren C-terminal des flexiblen Scharniers G104.<sup>[9a]</sup> Diese Hypothese wird erhärtet durch ein 2D-N(CO)CX-Experiment in  $\text{D}_2\text{O}$  mit kurzer initialer  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -CP-Zeit,<sup>[5]</sup> in dem G104 und G116 nicht detektiert werden konnten (Abbildung S8). Dies stimmt auch mit Studien in Mizellen überein<sup>[13]</sup> und wird bekräftigt durch die lediglich etwa 50 Signale, die wir im 3D-CaNH-Spektrum beobachteten, während wir etwa 65 Signale sehen sollten, falls alle TM- $\text{H}^{\text{N}}$ -in  $\text{D}_2\text{O}$  beibehalten würden.  $^1\text{H}/^2\text{D}$ -Austausch innerhalb der Membran hat somit Vor- und Nachteile zugleich. Während er Zuordnungen verkomplizieren mag, gibt er auch wertvolle Informationen zur Proteinflexibilität und Membrantopologie preis.

Wir nutzten unsere Zuordnungen für eine detaillierte Analyse der Dynamik des TM-Abschnitts von KcsA. Diese Dynamik ist von großer Bedeutung für die Ionenkanalfunktion, die auf dynamischen Änderungen transmembraner Elemente beruht.<sup>[9a,14]</sup> Besonders wichtig ist das Verständnis der Flexibilität des Filters, da diese vermutlich mit einem ubiquitären, als Modal-Gating bekannten Ionenkanalregulationsmechanismus einhergeht.<sup>[9b]</sup> NMR-Relaxation ist eine leistungsfähige Methode zur Untersuchung von Proteindynamiken,<sup>[15]</sup> und viele unserer  $\text{H}^{\text{N}}$  sind gut separiert (Abbildung 2B), was die Vorbedingung für eine hochaufgelöste Dynamikanalyse ist. Es wurde bereits gezeigt, dass transversale  $^{15}\text{N}$ -Relaxation im rotierenden Koordinatensystem ( $T_{1\rho}$ ), die ein empfindlicher Reporter der Nano- bis Mikrosekundendynamik ist, quantitativ in vollprotonierten Proteinen bei hohen ( $> 50$  kHz) MAS-Frequenzen gemessen werden kann.<sup>[16]</sup> Zuerst wurde die Bulk- $^{15}\text{N}$ - $T_{1\rho}$  als eine Funktion der Spinlockfrequenz gemessen (Abbildung S9). In Übereinstimmung mit Messungen in GB1 und im Membranprotein ASR<sup>[16,17]</sup> fanden wir ein Relaxationsplateau für Spinlockfel-



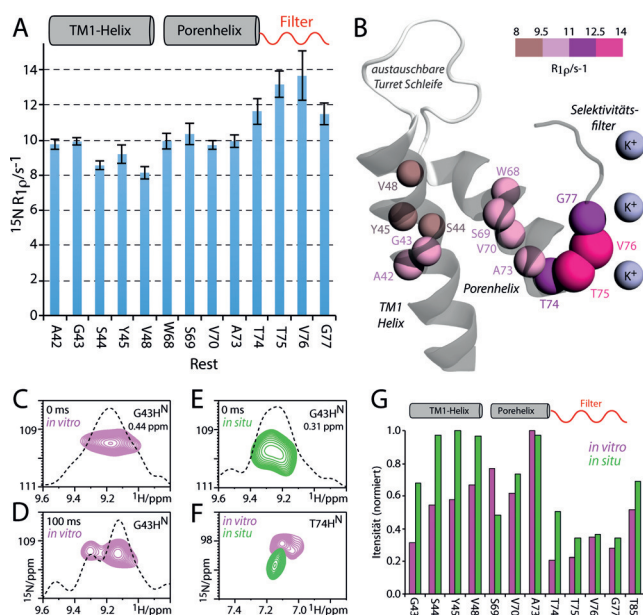
der von 10–25 kHz, aus dem sich eine  $^{15}\text{N}$ - $T_{1\rho}$  von ca. 100 ms für den TM-Abschnitt von KcsA ergab. Die hochaufgelösten  $^{15}\text{N}$ - $T_{1\rho}$ -Relaxationsraten ( $R_{1\rho}$ ) sind ziemlich gleichmäßig im lipidbegrenzten TM-Abschnitt (Abbildungen 3A,B). Dies stimmt mit Messungen in Mizellen überein.<sup>[18]</sup>

Allerdings zeigte der gesamte Filterabschnitt T74–G77 bemerkenswerterweise leichte, aber klar erhöhte  $^{15}\text{N}$ - $R_{1\rho}$ , was eine langsame, kollektive Bewegung anzeigt. Dies entspricht sehr wahrscheinlich einer langsamen Nanosekunden- bis Mikrosekundendynamik, da die Reste T74 und T75 keine schnelle Nanosekundendynamik in einer vorherigen  $^{15}\text{N}$ - $T_1$ -Studie zeigten.<sup>[19]</sup> Diese langsame Dynamik kann bedeutsam für die KcsA-Funktion sein, da das Filter-Rückgrat unmittelbar in die Ionenleitfähigkeit involviert ist. Interessanterweise sind Mikrosekunden auch die Zeitskala des Flickerns,<sup>[9b]</sup> eine Art von Modal-Gating, charakterisiert durch rasches Öffnen und Schließen des Kanals. Es wird vermutet, dass Flickern durch eine dynamische Umgestaltung des Filters in der Umgebung von Aminosäure V76 verursacht wird. Man beachte auch, dass die erhöhte Filter-Dynamik durch schwächere Signalintensitäten in dipolaren Experimenten belegt wird (Abbildung 3G). Die konformative Flexibilität spiegelt sich auch in breiteren  $\text{H}^{\text{N}}$ -Linien des Filters wider (Tabelle S5). Die Aminosäuren A42–L49 der TM1-Helix zeigen die geringste langsame Dynamik, sowie leicht niedrigere  $R_{1\rho}$ -Raten als die Porenhelix. Jedoch spaltete sich das  $\text{G43H}^{\text{N}}$ -Signal, welches das bei weitem breiteste Signal aller

$\text{H}^{\text{N}}$  ist (0.44 ppm), in zwei Signale unterschiedlicher Relaxation auf (Abbildungen 3C,D). Da die chemische Verschiebung von G43 durch den Filter-Gatingmodus moduliert wird,<sup>[12]</sup> könnte die Filter-Flexibilität der Grund für diese Aufspaltung sein. Interessanterweise – und im Gegensatz zu fast allen anderen Signalen – ist das  $\text{G43H}^{\text{N}}$ -Signal viel schmaler (0.31 ppm) in situ, sehr wahrscheinlich weil nur eine Konformation existiert (Abbildung 3E). Dies legt nahe, dass die KcsA-Dynamik im Vergleich zu Liposomen zumindest lokal in der nativen Zellmembran verändert ist.

Die mangelnde Empfindlichkeit in zellulärem KcsA verhindert hochaufgelöste Relaxationsstudien. Jedoch hat der Filter-Abschnitt T74–G77 die geringste Intensität in dipolaren Experimenten. Dies suggeriert stark, dass die erhöhte Filter-Dynamik auch in situ erhalten bleibt (Abbildung 3G). Die Flexibilität scheint in situ sogar erhöht, da die Filter-Signale im Vergleich zur TM1-Helix abgeschwächt sind. Auch die Intensitäten innerhalb des Filters sind verändert, besonders für T74, das die geringste Intensität in vitro und die höchste Intensität in situ aufweist. Dies legt nahe, dass die Filter-Dynamik in zellulärem KcsA leicht verändert ist, worauf auch eine starke  $^{15}\text{N}$ -CSP von +0.8 ppm für T74 in situ hinweist (Abbildung 3F und S10). Gründe für dieses scheinbar unterschiedliche Verhalten des Filters könnten die veränderte Lipidzusammensetzung in der bakteriellen Membran<sup>[9c]</sup> oder unterschiedliche Clusterbildung von KcsA-Kanälen<sup>[20]</sup> sein. Vor diesem Hintergrund ist es wichtig zu erforschen, wie Dynamik die Kanalfunktion moduliert. Während unsere Daten deutlich eine erhöhte Filter-Dynamik belegen, sind weitere Experimente nötig, um die Zeitskalen und Amplituden der Dynamik zu verstehen.

Wir haben hier eine Methode eingeführt, die wasserunzugängliche Proteine für die hochempfindliche und hochaufgelöste  $^1\text{H}$ -Detektion zugänglich macht. Wir erwarten, dass unsere Methode für Membranproteine und Amyloidfibrillen besonders leistungsfähig ist, da diese oftmals sehr resistent gegenüber  $^1\text{H}/^2\text{D}$ -Austausch sein können. Darüber hinaus erlaubte unsere Methode erstmalig die Anwendung von  $^1\text{H}$ -Detektion zur detaillierten Analyse eines Membranproteins in einer nativen Zellmembran. Dies ist ein wichtiger Fortschritt in der ssNMR-Spektroskopie, da die Funktion von Membranproteinen oftmals entscheidend von der nativen Umgebung abhängt.



**Abbildung 3.** Gemessene Dynamik im TM-Teil von  $\text{D}_2\text{O}$ -inkubiertem iFD-KcsA. Daten wurden mit 60 kHz MAS bei 800 MHz und einem  $^{15}\text{N}$ -Spinlockfeld von 20 kHz aufgenommen. A)  $^{15}\text{N}$ - $R_{1\rho}$ -Relaxationsraten. B) Illustration der  $^{15}\text{N}$ - $R_{1\rho}$  mit der KcsA-Struktur (pdb 1K4C). Analysierte Aminosäuren sind als farbkodierte Kugeln gezeigt, deren Umfang proportional zu  $R_{1\rho}$  ist. C)  $^{15}\text{N}$ - $T_{1\rho}$ -Experimente in vitro mit C) 0 ms und D) 100 ms Spinlockdauer decken zwei Signale für  $\text{G43H}^{\text{N}}$  auf. E)  $\text{G43H}^{\text{N}}$  zeigt nur eine Konformation in situ. F) T74 zeigt eine  $^{15}\text{N}$ -CSP von +0.8 ppm in situ. G) Signal-Rausch-Verhältnis von spektral aufgelösten Aminosäuren in in vitro (violette Säulen) und in situ (grün)  $\text{D}_2\text{O}$ -inkubiertem KcsA.

## Danksagung

Wir danken der NWO (Projekte 723.014.003, 700.10.443, 184.032.207) für die Unterstützung. Die Experimente am 950-MHz-Instrument wurden durch uNMR-NL, eine durch die NWO finanzierte National Roadmap Large-scale Facility der Niederlande, unterstützt.

**Stichwörter:** Festkörper-NMR-Spektroskopie · Membranproteine · Protonendetektion · Proteindynamik · Zelluläre NMR

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 13606–13610  
*Angew. Chem.* **2016**, 128, 13804–13808

- [1] Y. Ishii, R. Tycko, *J. Magn. Reson.* **2000**, *142*, 199–204.
- [2] a) V. Chevelkov, K. Rehbein, A. Diehl, B. Reif, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3878–3881; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3963–3966; b) P. Schanda, B. H. Meier, M. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15957–15967; c) 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; d) M. E. Ward, L. Shi, E. Lake, S. Krishnamurthy, H. Hutchins, L. S. Brown, V. Ladizhansky, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17434–17443; e) V. Chevelkov, B. Habenstein, A. Loquet, K. Giller, S. Becker, A. Lange, *J. Magn. Reson.* **2014**, *242*, 180–188; f) D. Mance, T. Sinnige, M. Kaplan, S. Narasimhan, M. Daniels, K. Houben, M. Baldus, M. Weingarth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 15799–15803; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 16025–16029; g) H. R. Dannatt, M. Felletti, S. Jehle, Y. Wang, L. Emsley, N. E. Dixon, A. Lesage, G. Pintacuda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 6638–6641; *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 6750–6753; h) T. Sinnige, M. Daniels, M. Baldus, M. Weingarth, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 4452–4455.
- [3] a) D. H. Zhou, G. Shah, M. Cormos, C. Mullen, D. Sandoz, C. M. Rienstra, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11791–11801; b) A. Marchetti, S. Jehle, M. Felletti, M. J. Knight, Y. Wang, Z. Q. Xu, A. Y. Park, G. Otting, A. Lesage, L. Emsley, N. E. Dixon, G. Pintacuda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10756–10759; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10914–10917; c) M. Weingarth, E. A. van der Crujisen, J. Ostmeier, S. Lievestro, B. Roux, M. Baldus, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2000–2007; d) S. Wang, S. Parthasarathy, Y. Xiao, Y. Nishiyama, F. Long, I. Matsuda, Y. Endo, T. Nemoto, K. Yamauchi, T. Asakura, M. Takeda, T. Terauchi, M. Kainosho, Y. Ishii, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 15055–15058; e) S. Xiang, J. Biernat, E. Mandelkow, S. Becker, R. Linser, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 4002–4005.
- [4] a) V. Agarwal, S. Penzel, K. Szekely, R. Cadalbert, E. Testori, A. Oss, J. Past, A. Samoson, M. Ernst, A. Bockmann, B. H. Meier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 12253–12256; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 12450–12453; b) K. H. Mroue, Y. Nishiyama, M. Kumar Pandey, B. Gong, E. McNerny, D. H. Kohn, M. D. Morris, A. Ramamoorthy, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 11991.
- [5] L. C. Shi, I. Kawamura, K. H. Jung, L. S. Brown, V. Ladizhansky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1302–1305; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1338–1341.
- [6] R. Verel, M. Baldus, M. Ernst, B. H. Meier, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *287*, 421–428.
- [7] D. H. Zhou, C. M. Rienstra, *J. Magn. Reson.* **2008**, *192*, 167–172.
- [8] M. Weingarth, G. Bodenhausen, P. Tekely, *J. Magn. Reson.* **2009**, *199*, 238–241.
- [9] a) L. G. Cuellar, V. Jogini, D. M. Cortes, E. Perozo, *Nature* **2010**, *466*, 203–208; b) S. Chakrapani, J. F. Cordero-Morales, V. Jogini, A. C. Pan, D. M. Cortes, B. Roux, E. Perozo, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18*, 67–74; c) E. A. van der Crujisen, D. Nand, M. Weingarth, A. Prokofyev, S. Hornig, A. A. Cukkemane, A. M. Bonvin, S. Becker, R. E. Hulse, E. Perozo, O. Pongs, M. Baldus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 13008–13013.
- [10] 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) P. Schanda, S. Triboulet, C. Laguri, C. M. Bougault, I. Ayala, M. Callon, M. Arthur, J. P. Simorre, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 17852–17860; c) S. A. Shahid, M. Nagaraj, N. Chauhan, T. W. Franks, B. Bardiaux, M. Habeck, M. Orwick-Rydmark, D. Linke, B. J. van Rossum, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 12602–12606; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 12792–12797.
- [11] L. A. Baker, M. Daniels, E. A. W. van der Crujisen, G. E. Folkers, M. Baldus, *J. Biomol. NMR* **2015**, *62*, 199–208.
- [12] B. J. Wylie, M. P. Bhate, A. E. McDermott, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 185–190.
- [13] J. H. Chill, J. M. Louis, C. Miller, A. Bax, *Protein Sci.* **2006**, *15*, 684–698.
- [14] K. Takeuchi, H. Takahashi, S. Kawano, I. Shimada, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 15179–15186.
- [15] a) J. M. Lamley, C. Oster, R. A. Stevens, J. R. Lewandowski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 15374–15378; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 15594–15598; b) P. Ma, Y. Xue, N. Coquelle, J. D. Haller, T. Yuwen, I. Ayala, O. Mikhailovskii, D. Willbold, J. P. Colletier, N. R. Skrynnikov, P. Schanda, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8361.
- [16] J. R. Lewandowski, H. J. Sass, S. Grzesiek, M. Blackledge, L. Emsley, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16762–16765.
- [17] D. B. Good, S. L. Wang, M. E. Ward, J. Struppe, L. S. Brown, J. R. Lewandowski, V. Ladizhansky, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2833–2842.
- [18] J. H. Chill, J. M. Louis, J. L. Baber, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **2006**, *36*, 123–136.
- [19] C. Ader, O. Pongs, S. Becker, M. Baldus, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2010**, *1798*, 286–290.
- [20] A. Sumino, D. Yamamoto, M. Iwamoto, T. Dewa, S. Oiki, *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 578–584.

Eingegangen am 11. Juli 2016,  
veränderte Fassung am 4. September 2016  
Online veröffentlicht am 27. September 2016