

Wechselwirkungen der hydrophoben Cluster im entfalteten Membranprotein OmpX in Harnstofflösung**

Sebastian Hiller, Gerhard Wider, Lukas L. Imbach und Kurt Wüthrich*

Zahlreiche Untersuchungen von Proteinen im entfalteten Zustand haben gezeigt, dass Proteine häufig Polypeptidsegmente enthalten, die in denaturierender Lösung nichtzufällige Strukturen aufweisen.^[1–6] Eine biophysikalische Charakterisierung dieser „Cluster“ ist wichtig für ein Verständnis ihrer Rolle in den frühen Phasen der Proteinfaltung.^[1,2,7,8] Zum Beispiel wurde in einem Fall aus experimentellen Studien mit entfaltetem Lysozym in wässriger Harnstofflösung auf langreichweitige Wechselwirkungen zwischen mehreren hydrophoben Clustern geschlossen,^[9] und diese Wechselwirkungen wurden als ein wichtiges Element in Proteinfaltungsmechanismen vorgeschlagen.^[10] In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir inter- und intramolekulare Wechselwirkungen zweier hydrophober Cluster, die sich in einer Lösung aus 8 M Harnstoff an den Positionen 73–82 und 137–145 im 148 Aminosäurereste langen Membranprotein OmpX (äußeres Membranprotein X aus *E. coli*) bilden.^[11] NMR-Experimente mit Varianten von OmpX, bei denen ein Aminosäurerest verändert wurde, zeigten, dass weder die thermodynamische Stabilität noch die Struktur der zwei Cluster durch langreichweitige inter- oder intramolekulare Wechselwirkungen beeinflusst werden. Vielmehr fanden wir eine spezifische Bindung der Cluster an Detergensmicellen, die zu einer Umordnung der Architektur der Cluster führt. Diese Beobachtungen setzen frühere Studien mit anderen Proteinen in ein neues Licht und geben Einblicke in die Rolle des hydrophoben Kollapses bei der Proteinfaltung und in den Eindringungsvorgang von Membranproteinen in geordnete Lipidstrukturen.

Inter- und intramolekulare Wechselwirkungen wohlstrukturierter hydrophober Cluster in entfalteten Polypeptidketten in Harnstofflösung wurden in der hier vorgestellten Arbeit an zwei Proteinen untersucht. Das Hauptaugenmerk

liegt dabei auf dem Membranprotein OmpX, das zwei Tryptophanreste, W76 und W140, unter seinen 148 Aminosäureresten enthält. In global entfaltetem OmpX in 8 M wässriger Harnstofflösung bilden die Polypeptidsegmente der Reste 73–82 und 137–145 zwei wohlstrukturierte hydrophobe Cluster, I und II.^[11] Aus früheren Studien ist bekannt, dass im löslichen Protein 434-Repressor(1–63) in 8 M Harnstofflösung die Aminosäurereste 41–60 eine wohldefinierte, nichtzufällige Struktur haben.^[1,12]

Die Charakterisierung der Wechselwirkungen der nichtzufälligen lokalen Strukturen in OmpX und in 434-Repressor(1–63) basiert auf der Beobachtung, dass die Cluster im Ensemble der Proteinmoleküle nur zu etwa 20–30 % besetzt sind und dass sie auf der NMR-Zeitskala in schnellem konformativem Austausch^[13] mit dem Random-Coil-Zustand stehen.^[1,11] Andererseits befinden sich die Lebenszeiten der zwei nichtzufälligen lokalen Strukturen im Grenzfall der langsamen Bewegung für die Modulation der Dipol-Dipol-Kopplungen, die dem ¹H-¹H-Kern-Overhauser-Effekt (NOE) zugrunde liegen. Jede einzelne nichtzufällige Konformation hat daher eine Lebenszeit zwischen 1 ms und 10 ns. In unserem Ansatz identifizieren wir Varianten von OmpX, die wir durch die Veränderung eines einzelnen Aminosäurerestes erhalten und in denen einer der beiden Cluster fehlt, und vergleichen die Population *q'* des verbleibenden Clusters mit seiner Population *q* im Wildtypprotein. Verschiedene Populationen, *q' ≠ q*, zeigen stabilisierende oder destabilisierende langreichweitige Wechselwirkungen zwischen den intakten Clustern im Wildtypprotein an.

Um die Populationen der einzelnen Cluster zu messen, nutzen wir chemische Verschiebungen in NMR-Experimenten. Die chemische Verschiebung δ für einen Kern in verschiedenen Mikrosuszeptibilitäten in einem Ensemble sich schnell umwandelnder Zustände ist durch Gleichung (1) ge-

$$\delta = \sum_i p_i \delta_i \quad (1)$$

geben, wobei δ_i die chemische Verschiebung im Zustand *i* und p_i die Population des Zustands *i* ist. Die Summation umfasst alle Konformationen in 8 M Harnstofflösung, mit $\sum p_i = 1$.^[2,7,14] Da die chemischen Verschiebungen in nichtzufälligen Strukturen von den entsprechenden Werten im Random Coil abweichen,^[13] resultieren Änderungen der Populationen p_i im Allgemeinen in Änderungen der chemischen Verschiebung.

In OmpX[W76A] sind die Signale der Amidgruppen im Proteinrückgrat bei den neun Resten, die im Cluster I enthalten sind, relativ zu ihren Positionen im Fall des Wildtyps verschoben (Abbildung 1). Da kurzreichweitige Effekte, die durch den Austausch eines Aminosäurerests in flexibel aus-

[*] Dr. S. Hiller, Prof. Dr. G. Wider, L. L. Imbach, Prof. Dr. K. Wüthrich^[1]
Institut für Molekularbiologie und Biophysik, ETH Zürich
8093 Zürich (Schweiz)
Fax: (+41) 446-331-151
E-Mail: kurt.wuthrich@mol.biol.ethz.ch

[*] Weitere Adresse:
Department of Molecular Biology and
Skaggs Institute for Chemical Biology
The Scripps Research Institute, La Jolla, CA 92037 (USA)

[**] Wir danken Dr. César Fernández, Dr. Sophie Bonjour und Christian Caperos für technische Hilfe und Diskussionen. Dr. Fred Damberger danken wir für eine Probe 434-Repressor. Diese Arbeit wurde vom schweizerischen Nationalfonds und der ETH Zürich durch den NCCR Structural Biology unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

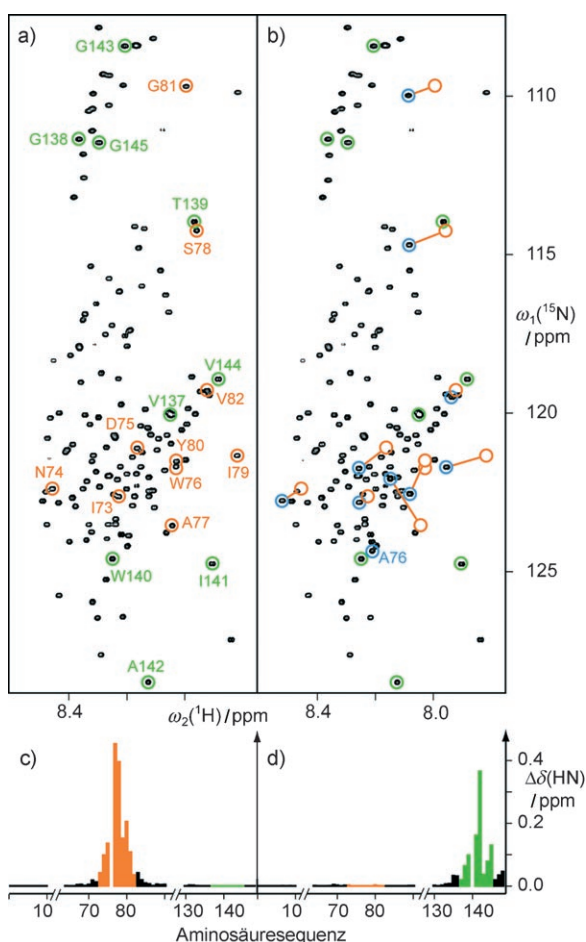


Abbildung 1. NMR-Daten, die die Auswirkungen des Austausches einzelner Aminosäurereste in den hydrophoben Clustern im entfalteten OmpX in 8 M Harnstofflösung zeigen. a), b) 2D- ^{15}N , ^1H -HSQC-NMR-Spektren von Wildtyp-OmpX bzw. OmpX[W76A]; orangefarbene und grüne Kreise markieren die Positionen der ^{15}N - ^1H -Signale des hydrophoben Clusters I (Reste 73–82 im 148-Reste-Polypeptid) bzw. II (Reste 137–145) im Wildtypprotein. In (b) markieren zusätzliche blaue Kreise die Signale der Reste 73–82 in OmpX[W76A]. Zusammengehörige orangefarbene und blaue Kreise sind mit orangefarbenen Linien verbunden. c) Die Differenzen der chemischen Verschiebungen, $\Delta\delta(^{15}\text{N}, ^1\text{H})$, zwischen einander entsprechenden Amidgruppen in OmpX[W76A] und in OmpX sind gegen die Aminosäuresequenz aufgetragen, wobei die Daten für die Cluster I und II orange bzw. grün gefärbt sind. Die Daten für die Reste 11–63 und 91–129 sind nicht gezeigt, da sie keine signifikanten Änderungen der chemischen Verschiebungen aufweisen. d) Wie (c) für OmpX[W140A].

gestreckten Polypeptiden bewirkt werden, sich nur auf zwei benachbarte Aminosäurereste in jede Richtung erstrecken,^[9,15–17] müssen die beobachteten Änderungen der chemischen Verschiebung von der Zerstörung der längerreichweitigen Kontakte zwischen den Aminosäureresten innerhalb des Clusters I herrühren. Da die chemischen Verschiebungen im varianten Protein näher an den Random-Coil-Werten sind als die im Wildtyp-OmpX (Abbildung 1) und da es im varianten Protein keine mittel- oder langreichweitigen NOEs zwischen Wasserstoffatomen der Aminosäurereste des Clusters I gibt, gehen wir davon aus, dass sich in OmpX[W76A] das Polypeptidsegment 73–82 in einer flexibel gestreckten

Konformation befindet. Mit demselben Ansatz finden wir, dass in OmpX[W140A] das Segment 137–145 flexibel ausgestreckt ist (Abbildung 1). Die kombinierten Differenzen der chemischen ^{15}N - und ^1H -Verschiebungen, $\Delta\delta(^1\text{H}, ^{15}\text{N})$, im verbleibenden Cluster sind jeweils nicht messbar beeinträchtigt (Abbildung 1c,d), was zeigt, dass die Clusterarchitektur mit derselben Population erhalten bleibt. Aus der Messgenauigkeit der chemischen Verschiebungen in diesen Experimenten leiten wir eine obere Grenze von $\Delta G = 0.13 \text{ kJ mol}^{-1}$ für die freie Energie einer hypothetischen Wechselwirkung zwischen den beiden Clustern ab.

NMR-Experimente mit einer Probe des unmarkierten Polypeptids H-AYRINDWASIYGVVGVGY-OH, entsprechend den Aminosäureresten 70–87 im Wildtyp-OmpX, wurden unter identischen Lösungsbedingungen wie für OmpX durchgeführt. Vollständige sequenzspezifische Zuordnungen von Protonensignalen aus homonuclearen 2D-NMR-Experimenten zeigen, dass die chemischen Verschiebungen im Peptid praktisch identisch mit denjenigen der entsprechenden Protonen in OmpX sind (Abbildung 2), während die Abweichungen von Random-Coil-Werten bis zu 0.4 ppm betragen (Abbildung 2). Die Tatsache, dass identische chemische Verschiebungen gefunden werden, zeigt an, dass Struktur und Population von Cluster I im Peptid OmpX(70–87) gleich sind wie in vollständigem OmpX [Gl. (1)]. Daten aus zwei unabhängigen experimentellen Ansätzen stützen daher die Hypothese, dass die Bildung der hydrophoben Cluster ausschließlich in der lokalen Aminosäuresequenz kodiert ist und dass es keine beobachtbaren

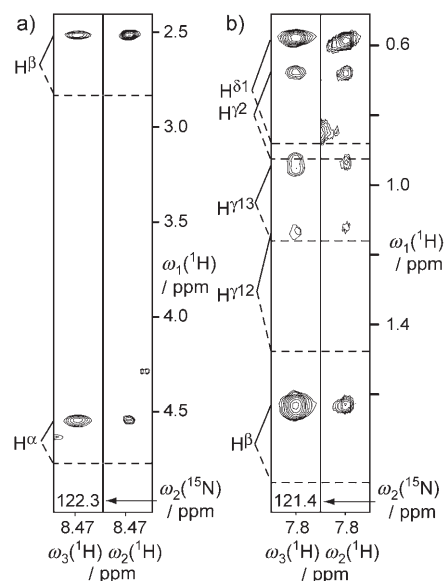


Abbildung 2. Vergleich von chemischen ^1H -Verschiebungen in einander entsprechenden Seitenketten in OmpX und im synthetischen Octapeptid H-OmpX(70–87)-OH in 8 M wässriger Harnstofflösung. a) $[\omega_3(^1\text{H}), \omega_1(^1\text{H})]$ -Streifen, entnommen aus einem ^{15}N -aufgelösten 3D- ^1H , ^1H -TOCSY-Experiment mit OmpX^[11] bei der chemischen Verschiebung des Amidprotons aus Rest N74 (linker Teil) und $[\omega_2(^{15}\text{N}), \omega_1(^1\text{H})]$ -Streifen des entsprechenden Rests aus einem 2D- ^1H , ^1H -TOCSY-Spektrum von OmpX(70–87) (rechter Teil). Die Random-Coil-Werte der chemischen Verschiebungen werden durch gestrichelte Linien angezeigt. b) Wie (a) für Rest 179.

inter- oder intramolekularen langreichweitigen Wechselwirkungen zwischen den beiden Clustern in entfaltetem OmpX in Harnstofflösung gibt.

Da OmpX ein integrales Membranprotein ist, war von Interesse, ob Wechselwirkungen der Cluster mit geordneten Lipidstrukturen auftreten. Schrittweises Hinzufügen des Detergens Dihexanoylphosphatidylcholin (DHPC) zu entfaltetem OmpX in Harnstofflösung verursachte Änderungen chemischer Verschiebungen oberhalb einer DHPC-Konzentration von etwa 50 mM (Abbildung 3a), was recht genau der kritischen Micellenkonzentration (cmc) von 45 mM für DHPC in 8 M Harnstofflösung entspricht (siehe Hintergrundinformationen). Nur diejenigen Aminosäureres-

te, die in die Bildung der hydrophoben Cluster involviert sind, wurden stark durch DHPC beeinträchtigt, wohingegen andere Amidgruppen im Polypeptid nur kleine Änderungen der chemischen Verschiebung zeigten (Abbildung 3b). Daher liegt hier eine spezifische Wechselwirkung zwischen den einzelnen hydrophoben Clustern und DHPC-Micellen vor, ohne dass es eine Wechselwirkung mit DHPC-Monomeren gibt. In den Varianten OmpX[W76A] und OmpX[W140A] gab es detektierbare Wechselwirkungen mit DHPC-Micellen nur für den jeweils verbleibenden Cluster (Abbildung 3c,d), und die chemischen Verschiebungen, die durch die Bindung der Micellen verursacht wurden, waren identisch im Wildtyp-OmpX und OmpX[W140A] für den Cluster I sowie im Wildtyp-OmpX und OmpX[W76A] für den Cluster II. Bei der Reaktion mit DHPC-Micellen zeigt sich daher wieder, dass es keine messbaren Wechselwirkungen zwischen den beiden Clustern in Wildtyp-OmpX gibt, und des Weiteren, dass eine DHPC-Micelle nur einen hydrophoben Cluster binden kann.

Es sind auch hydrophobe Cluster in verschiedenen löslichen Proteinen bekannt, die in Harnstofflösung entfaltet sind, darunter die DNA bindende Domäne des 434-Repressors, 434(1–63), die die Aminosäurereste 41–53 und 54–60 in zwei hydrophoben Clustern enthält.^[1,12] Zugabe von 200 mM DHPC zu 434(1–63) in 8 M wässriger Harnstofflösung ergab selektive Änderungen der chemischen Verschiebungen für die Aminosäurereste in den Clustern (siehe Hintergrundinformationen), was darauf schließen lässt, dass die Affinität zu Micellen nicht auf hydrophobe Cluster in Membranproteinen beschränkt ist, sondern eine allgemeine Eigenschaft solcher lokaler Reststrukturen in entfaltenen Proteinen in Harnstofflösung zu sein scheint.

Strukturbestimmungen der hydrophoben Cluster in OmpX im Komplex mit DHPC-Micellen wurden mit kompletten Signalzuordnungen aus gängigen Tripel-Resonanz-Experimenten und mit Distanzeinschränkungen aus ¹⁵N- und ¹³C-aufgelösten 3D-[¹H,¹H]-NOESY-Spektren durchgeführt. Nur mittel- und langreichweitige ¹H-¹H-NOEs wurden für die Strukturrechnungen verwendet, und es wurde angenommen, dass die Random-Coil-Konformationen im Ensemble der Moleküle vernachlässigbar wenig zur Intensität dieser NOEs beitragen.^[7] Für die Cluster I und II wurden 37 bzw. 26 solcher NOEs beobachtet, von denen nur fünf bzw. drei mit NOEs zusammenfallen, die in der Abwesenheit der Micellen beobachtet worden waren. Die Strukturrechnungen für die Cluster I und II konvergierten mit Zielfunktionen von 0.0 Å². Die Standardabweichung für die Reste 73–82 im Rückgrat betrug (0.67 ± 0.24) Å, und für die Rückgratotope der Reste 137–145 war sie (0.42 ± 0.20) Å. Das Polypeptidrückgrat von Cluster I nimmt eine helicale Konformation ein, bei der die hydrophoben Seitenketten nach außen zeigen (Abbildung 4a). Eine Wasserstoffbrücke zwischen Val82-H^N und Ile79-CO ist in 14 der 20 Konformere vorhanden. In Cluster II nimmt das Rückgrat eine ausgestrecktere helixartige Konformation ein, und auch hier zeigen die hydrophoben Seitenketten nach außen (Abbildung 4b). Zwei Wasserstoffbrücken, Ala142-H^N zu Thr139-CO und Gly145-H^N zu Ala142-CO, treten jeweils in 18 der 20 Konformere auf. Für beide Cluster zeigt ein Vergleich der Strukturen in Abwe-

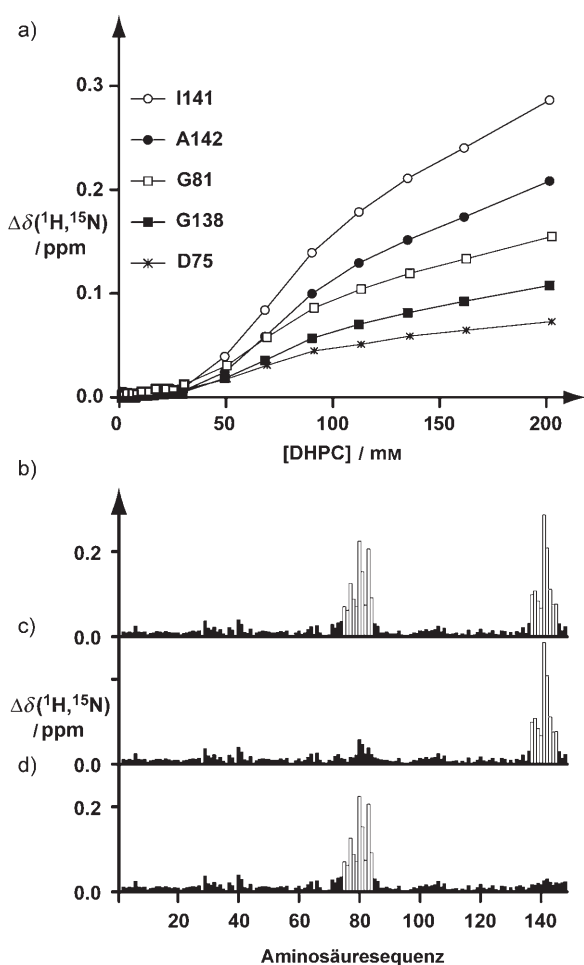


Abbildung 3. Detektion von Wechselwirkungen zwischen entfaltetem OmpX in Harnstofflösung und dem Detergens DHPC. a) Differenzen chemischer Verschiebungen, $\Delta\delta(^1\text{H}, ^{15}\text{N})$, der ^{15}N - ^1H -Rückgratgruppen im entfaltenen OmpX in Harnstofflösung in Abhängigkeit von der DHPC-Konzentration. Daten für fünf Aminosäurereste aus den zwei hydrophoben Clustern werden gezeigt. Komplette Daten für alle Reste der zwei Cluster sind in den Hintergrundinformationen und die detergentenabhängigen Verschiebungen bei 200 mM DHPC in Abbildung 3b gezeigt. b)–d) Änderungen chemischer Verschiebungen entlang der Aminosäuresequenz im Membranprotein OmpX und in zwei Varianten in wässriger 8 M Harnstofflösung, die durch Wechselwirkungen mit DHPC-Micellen verursacht werden. $\Delta\delta(^{15}\text{N}, ^1\text{H})$ ist die Differenz der chemischen Verschiebung der ^{15}N - ^1H -Rückgratgruppe mit und ohne 200 mM DHPC. b) Wildtyp-OmpX. c) OmpX[W76A]. d) OmpX[W140A].

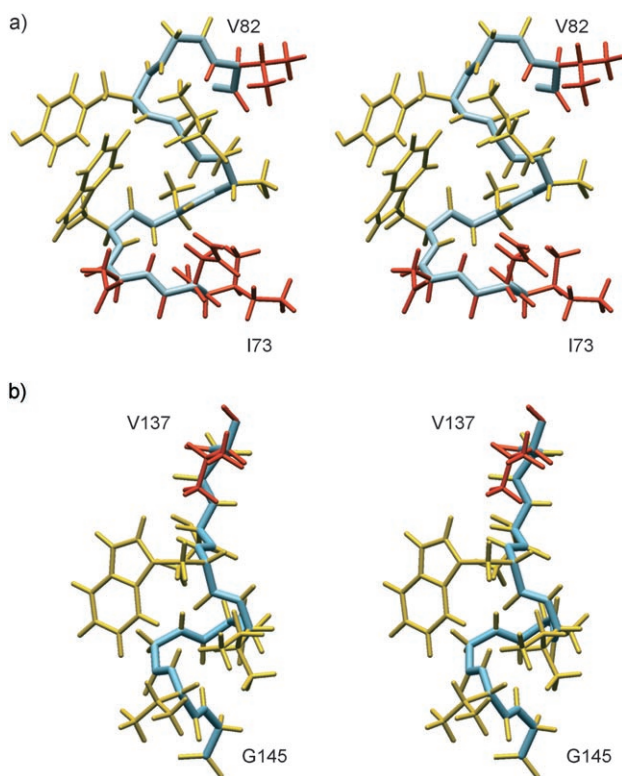


Abbildung 4. Stereoansichten der zwei hydrophoben Cluster im entfalteten OmpX in Harnstofflösung im Komplex mit DHPC-Micellen. a) Cluster I, der die Reste 73–82 umfasst. b) Cluster II, der die Reste 137–145 umfasst. Aus dem Bündel der 20 Konformere, das verwendet wird, um die NMR-Struktur zu repräsentieren, ist dasjenige Konformer gezeigt, das am nächsten bei den Durchschnittskordinaten liegt. Blau: Rückgrat, gelb: Seitenketten von Aminosäureresten mit einem globalen Durchschnittsabstand der schweren Atome von unter 1.0 \AA in den 20 Konformeren, rot: andere Seitenketten.

senheit der Micellen^[11] große Unterschiede sowohl für die Rückgratkonformation als auch für die Ausrichtung der hydrophoben Seitenketten, die in der Abwesenheit von DHPC-Micellen einen hydrophoben Kern im Innern jedes Clusters bilden.

Im nativ gefalteten Zustand von OmpX sind die zentralen Aminosäurereste der zwei Polypeptidsegmente, die in 8 M Harnstofflösung die beiden Cluster bilden, etwa 20 \AA voneinander entfernt, und es gibt in der dreidimensionalen Struktur keine direkten Kontakte zwischen Atomgruppen der beiden Cluster.^[18,19] Wechselwirkungen zwischen den beiden Clustern im entfalteten Polypeptid in Harnstofflösung wären daher nichtnative Kontakte. Nichtnative langreichweitige Wechselwirkungen sind für die hydrophoben Cluster im denaturierten löslichen Protein Lysozym vorgeschlagen worden.^[9,15] OmpX ist ein integrales Membranprotein und Lysozym ein lösliches Protein in wässrigem Milieu. Das unterschiedliche Verhalten der zwei Proteine könnte in den verschiedenen Topologien und Umgebungen in ihren jeweiligen gefalteten Zuständen begründet sein.

Die hier beobachteten intermolekularen Wechselwirkungen der hydrophoben Cluster mit den Detergensmicellen können leicht durch den Gewinn an freier Energie erklärt

werden, der aus dem Transfer der hydrophoben Cluster von der wässrigen Harnstofflösung in die hydrophobere Umgebung der geordneten Detergensstruktur resultiert. Diese Bindungsreaktion scheint eine generelle Eigenschaft hydrophober Cluster zu sein, wie durch das Experiment mit dem löslichen 434(1–63)-Repressorprotein gezeigt, und es lässt sich spekulieren, dass diese Reaktion sowohl in vivo als auch in vitro auftritt. Faltungsmechanismen integraler Membranproteine sind biophysikalische Prozesse hoher Komplexität,^[20–25] und die Topologie des gefalteten Zustands integraler Membranproteine ist an eine Umgebung abwechselnd hydrophober und hydrophiler Phasen angepasst, die auch die Umgebung für den Faltungs- und Einfüfungsvorgang in die Membran bilden.^[26] Die Affinität zur hydrophoben Phase der Detergensmicellen ist ein interessantes Unterscheidungsmerkmal der in 8 M wässriger Harnstofflösung hydrophobe Cluster bildenden Polypeptidsegmente gegenüber den ungeordneten Teilen der Polypeptidkette. In einem allgemeinen Modell für den Faltungsmechanismus transmembrärer β -Barrel-Proteine bindet das ungefaltete Polypeptid zunächst an die Membranoberfläche, von wo es weiter in die Doppelschicht eindringt.^[21,23] Den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zufolge könnten hydrophobe Cluster die Bindungsstelle für diesen anfänglichen Kontakt mit der Membran sein. Das Auftreten ähnlicher Cluster in ungefalteten löslichen Proteinen führt dann zur Hypothese, dass die vorübergehende Bindung hydrophober Cluster an geordnete Lipidflächen auch im Faltungsweg einiger Nichtmembranproteine eine helfende Rolle spielen könnte.

Experimentelles

$[U\text{-}^{13}\text{C},^{15}\text{N}]$ -OmpX und $[U\text{-}^{15}\text{N}]$ -OmpX wurden exprimiert und gereinigt wie beschrieben.^[11,27] Das Protein wurde in OmpX-NMR-Puffer transferiert (8 M Harnstoff, 20 mM Phosphat, 0.1 mM NaN_3 , 5% D_2O , 95% H_2O , pH 6.5). $[U\text{-}^{15}\text{N},^{13}\text{C}]$ -markierter 434-Repressor(1–63) wurde exprimiert und gereinigt wie beschrieben.^[28,29] Das Protein wurde in einem Puffer von pH 4.8 mit 7 M Harnstoff, 20 mM Phosphat, 0.1 mM NaN_3 , 5% D_2O und 95% H_2O gelöst, den Referenzbedingungen aus früheren Studien.^[1] Die Proben hatten Proteinkonzentrationen zwischen 0.5 und 1 mM .

Die varianten Proteine OmpX[W76A] und OmpX[W140A] wurden aus dem Wildtypgen in einem pET3b-Plasmid durch Quick-Change-Mutagenese erzeugt (Stratagene). Vor der Verwendung wurde die richtige DNA-Sequenz bestätigt.

Ein Peptid mit der Sequenz H-AYRINDWASIYGVVGVG-Y-OH, entsprechend OmpX(70–87), wurde von Bio-Synthesis (Lewisville TX) mit einer Reinheit $>95 \%$, bestätigt mit HPLC, hergestellt. Das lyophilisierte Peptid wurde in OmpX-NMR-Puffer zu einer Konzentration von 1 mM gelöst und ohne weitere Reinigung verwendet.

Alle NMR-Experimente wurden bei 15°C auf einem Bruker-DRX-750-Spektrometer gemessen. Sämtliche experimentellen Details sind in den Hintergrundinformationen zusammengefasst.

Für die Berechnung der dreidimensionalen Strukturen wurden obere Distanzschranken von 5.5 \AA für alle beobachteten mittel- und langreichweitigen NOEs gesetzt.^[1,13] Strukturrechnungen wurden unabhängig für die zwei Polypeptidsegmente 73–82 und 137–145 mit dem Programm DYANA durchgeführt.^[30] Um Störeffekte an den

Kettenenden zu begrenzen, wurden an den N- und C-Termini dieser Polypeptide je zwei zusätzliche Aminosäurereste zugefügt.

Eingegangen am 26. Juli 2007,

veränderte Fassung am 19. September 2007

Online veröffentlicht am 27. Dezember 2007

Stichwörter: Hydrophober Effekt · Lipide · Membranproteine · NMR-Spektroskopie · Proteinfaltung

-
- [1] D. Neri, M. Billeter, G. Wider, K. Wüthrich, *Science* **1992**, 257, 1559–1563.
- [2] L. J. Smith, K. M. Fiebig, H. Schwalbe, C. M. Dobson, *Folding Des.* **1996**, 1, R95–R106.
- [3] S. J. Demarest, Y. X. Hua, D. P. Raleigh, *Biochemistry* **1999**, 38, 7380–7387.
- [4] M. E. Hodsdon, C. Frieden, *Biochemistry* **2001**, 40, 732–742.
- [5] S. Schwarzingler, P. E. Wright, H. J. Dyson, *Biochemistry* **2002**, 41, 12681–12686.
- [6] K. A. Crowhurst, J. D. Forman-Kay, *Biochemistry* **2003**, 42, 8687–8695.
- [7] K. Wüthrich, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, 4, 93–99.
- [8] E. R. McCarney, J. E. Kohn, K. W. Plaxco, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2005**, 40, 181–189.
- [9] J. Klein-Seetharaman, M. Oikawa, S. B. Grimshaw, J. Wirmer, E. Duchardt, T. Ueda, T. Imoto, L. J. Smith, C. M. Dobson, H. Schwalbe, *Science* **2002**, 295, 1719–1722.
- [10] R. L. Baldwin, *Adv. Protein Chem.* **2002**, 62, 361–367.
- [11] H. Tafer, S. Hiller, C. Hilty, C. Fernández, K. Wüthrich, *Biochemistry* **2004**, 43, 860–869.
- [12] D. Neri, G. Wider, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 4397–4401.
- [13] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York, **1986**.
- [14] R. Mohana-Borges, N. K. Goto, G. J. A. Kroon, H. J. Dyson, P. E. Wright, *J. Mol. Biol.* **2004**, 340, 1131–1142.
- [15] J. Wirmer, C. Schlorb, J. Klein-Seetharaman, R. Hirano, T. Ueda, T. Imoto, H. Schwalbe, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 5904–5909; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 5780–5785.
- [16] S. Schwarzingler, G. J. A. Kroon, T. R. Foss, J. Chung, P. E. Wright, H. J. Dyson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 2970–2978.
- [17] D. Braun, G. Wider, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 8466–8469.
- [18] J. Vogt, G. E. Schulz, *Structure* **1999**, 7, 1301–1309.
- [19] C. Fernández, C. Hilty, G. Wider, P. Güntert, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **2004**, 336, 1211–1221.
- [20] P. J. Booth, R. H. Templer, W. Meijberg, S. J. Allen, A. R. Curran, M. Lorch, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2001**, 36, 501–603.
- [21] J. H. Kleinschmidt, *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, 60, 1547–1558.
- [22] D. M. Engelman, Y. Chen, C. N. Chin, A. R. Curran, A. M. Dixon, A. D. Dupuy, A. S. Lee, U. Lehnert, E. E. Matthews, Y. K. Reshetnyak, A. Senes, J. L. Popot, *FEBS Lett.* **2003**, 555, 122–125.
- [23] L. K. Tamm, H. Hong, B. Y. Liang, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2004**, 1666, 250–263.
- [24] S. H. White, G. von Heijne, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, 14, 397–404.
- [25] W. Wickner, R. Schekman, *Science* **2005**, 310, 1452–1456.
- [26] S. H. White, W. C. Wimley, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1999**, 28, 319–365.
- [27] C. Fernández, K. Adeishvili, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 2358–2363.
- [28] D. Neri, T. Szyperski, G. Otting, H. Senn, K. Wüthrich, *Biochemistry* **1989**, 28, 7510–7516.
- [29] D. Neri, M. Billeter, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1992**, 223, 743–767.
- [30] P. Güntert, C. Mumenthaler, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1997**, 273, 283–298.
-