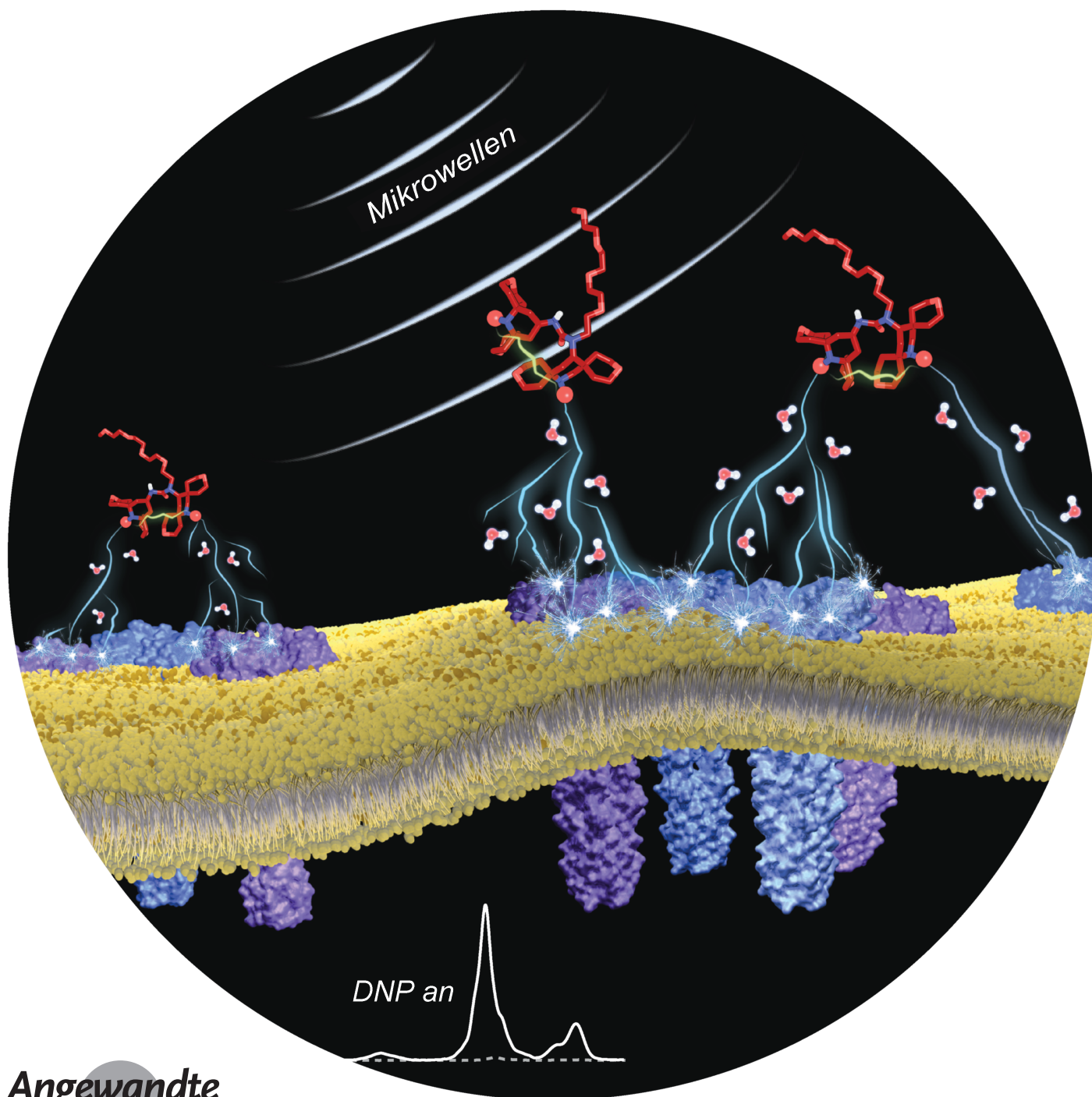


Protein-NMR-Spektroskopie

Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201705723
Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201705723

Supramolekulare Organisation und funktionale Auswirkungen von Ballungen von K^+ -Kanälen in Membranen

Koen M. Visscher, João Medeiros-Silva, Deni Mance, João P. G. L. M. Rodrigues, Mark Daniëls, Alexandre M. J. J. Bonvin, Marc Baldus und Markus Weingarth*

Angewandte
Chemie

Abstract: Die Segregation von zellulären Oberflächen in heterogene Regionen wird in Bakterien und Eukaryoten als geläufiges Motiv betrachtet, und diese Sichtweise wird durch die Beobachtung von Ballungen und funktionalen Kopplungen von Membranproteinen wie Ionenkanälen oder Rezeptoren gestützt. Solche Prozesse könnten eine wichtige zelluläre Strategie sein, um die Signalverarbeitung zu optimieren. Daher sind strukturelle Erkenntnisse über die supramolekulare Organisation von Kanälen oder Rezeptoren entscheidend für ein besseres Verständnis der Signaltransduktion über Membranen. Wir beschreiben hier die supramolekulare Organisation von Ballungen des K^+ -Kanals KcsA in bakteriellen Membranen. Diese Studie wurde durch eine Kombination von DNP-verstärkter Festkörper-NMR-Spektroskopie und MD-Simulationen ermöglicht. Wir bestimmen die Kanal-Kanal-Wechselwirkungsfläche und demonstrieren eine starke Korrelation zwischen Kanalfunktion und Kanalballung, was einen bisher unbekannt Mechanismus der Kommunikation zwischen K^+ -Kanälen impliziert.

Vierlei experimentelle Resultate unterstreichen die laterale Segregation von zellulären Oberflächen, was die Organisation von Membranen in heterogenen Domänen suggeriert.^[1] Dies bekräftigt die Auffassung, dass Membranproteine wie Kanäle oder Rezeptoren sich in supramolekularen Ballungen organisieren, in denen die Proteinfunktion gekoppelt ist,^[2] womöglich um eine optimale Antwort auf wenige Stimuli zu erreichen. Tatsächlich wurden Ballungen und gekoppelte Funktion für einige Ionenkanäle berichtet, einschließlich humanen K^+ ,^[3] Na^+ -^[4] und Ca^{2+} -Kanälen.^[2b] Allerdings ist sehr wenig bekannt über die Organisation und den funktionalen Einfluss dieser Ionenkanalballungen.

KcsA ist ein urbildlicher K^+ -Kanal, der häufig für funktionale Studien genutzt wird. Die KcsA-Pore ist in allen K^+ -Kanälen konserviert und wird durch eine zytoplasmische Aktivierungspforte und eine extrazelluläre Inaktivierungspforte reguliert.^[5] Es wurde *in vitro*^[6] und *in vivo* in *E. coli*^[7] und im nativen Bakterium *S. lividans*^[8] gezeigt, dass KcsA in Ballungen organisiert ist. Hier haben wir die supramolekulare Organisation dieser KcsA-Ballungen in *E. coli*-Membranen mittels konventioneller und durch dynamische Kernpolarisation (DNP) verstärkter Festkörper-NMR(ssNMR)-Experimente und grobkörniger Moleküldynamiksimulationen

(„coarse-grained molecular dynamics“, CGMD) untersucht. Wir demonstrieren, dass KcsA-Kanäle in den nativen Membranen nachempfundenen Umgebungen in Ballungen assemblieren, geben strukturelle Details zur Kanal-Kanal-Wechselwirkungsfläche und zeigen, dass eine membranassoziierte Helix eine Schlüsselrolle bei der Bildung der Ballungen einnimmt. Erstaunlicherweise beobachten wir in DNP-ssNMR-Experimenten, dass Kanalfunktion und Kanalballung korrelieren, was einen bisher unbekannt Mechanismus der Interkanalkommunikation impliziert.

ssNMR bietet einen direkten Ansatz, um Membranproteinballungen zu studieren. Dazu müssen Proteine mit unterschiedlichen NMR-aktiven Kernen gemischt werden (zum Beispiel $X = ^{15}N$ und $Y = ^{13}C$).^[9] Für den Magnetisierungstransfer zwischen Spinspezies X und Y ist es notwendig, dass Kanalballungen auf der experimentellen Zeitskala stabil sind; für geeignete dipolare Transferschemata liegt diese im Bereich von μs bis ms.

Wir konstituierten eine äquimolare Mischung von ^{15}N -markiertem KcsA [$U-^{15}N$ -KcsA] und ^{13}C -markiertem KcsA [$U-^{13}C$ -KcsA] in *E. coli*-Lipiden im Protein/Lipid(P/L)-Molverhältnis von 1:100. Zu Anfang präparierten wir die Proben in neutralem Puffer (pH 7, 50 mM K^+), in welchem die Kanäle im geschlossen-leitenden Modus sind, was wir mit einem ssNMR-2D- ^{13}C - ^{13}C -PARIS^[10]-Spektrum validierten (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Im Einklang mit früheren Resultaten^[11] weisen KcsA-Kanäle eine parallele Topologie in dieser Präparation auf (Abbildung S2). Um die KcsA-Ballung zu studieren, nahmen wir eine Serie von 1D-NHHC-Experimenten auf,^[9a] in welchen die Magnetisierung anfänglich auf ^{15}N -Kernen ist (d. h., von $U-^{15}N$ -KcsA) und dann durch einen kurzen heteronuklearen und einen längeren 1H - 1H -dipolaren Schritt auf ^{13}C -Kerne transferiert wird (von $U-^{13}C$ -KcsA; Abbildung 1A). Wir beobachteten einen starken Transfer auf die ^{13}C -Kerne in 1D-NHHC-Spektren (Abbildung 1B), was die Bildung von KcsA-Ballungen bezeugt, die auf der ms-Zeitskala stabil sind. Da der 1H -vermittelte Magnetisierungstransfer von ^{15}N auf ^{13}C nur über kurze Distanzen funktioniert, suggerieren unsere NHHC-Spektren stark, dass wechselwirkende Kanäle in direktem Kontakt zueinander sind. Darüber hinaus wurden die meisten ssNMR-Experimente unter Kühlung (bei 255 K) durchgeführt; der Transfer wurde jedoch auch bei 293 K beobachtet (Abbildung 1C). Weiterhin wurde nahezu kein Transfer von ^{15}N auf ^{13}C in einer Mischung von $U-^{15}N$ -KcsA und nichtmarkiertem KcsA beobachtet, was bedeutet, dass natürliche ^{13}C -Isotope als potenzielle Fehlerquelle vernachlässigbar sind (Abbildung 1D). Wir betonen auch, dass der homotetramere KcsA-Kanal in Liposomen von überragender Stabilität ist, und Monomere weder bei hohen Temperaturen von 90 °C^[12] noch unter Einwirkung harscher Tenside wie SDS dissoziieren.^[13] Daher müssen die Signale in den NHHC-Experimenten aus Kontakten zwischen Kanälen resultieren.

Als nächsten Schritt untersuchten wir, ob die KcsA-Ballung mit der Kanalfunktion korreliert. Es ist gegenwärtig unklar, ob und wie die Bildung von KcsA-Ballungen die Kanalfunktion moduliert, und in den vergangenen Jahren wurden widersprüchliche Studien publiziert. Molina et al. zeigten mit elektrophysiologischen Messungen in Liposomen,

[*] K. M. Visscher, J. Medeiros-Silva, Dr. D. Mance, Dr. J. P. G. L. M. Rodrigues, M. Daniëls, Prof. A. M. J. J. Bonvin, Prof. M. Baldus, Dr. M. Weingarh
NMR Spectroscopy, Bijvoet Center for Biomolecular Research
Department of Chemistry, Utrecht University
Pandualaan 8, 3584 CH Utrecht (Niederlande)
E-Mail: M.H.Weingarh@uu.nl

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind unter:
<https://doi.org/10.1002/ange.201705723> zu finden.

© 2017 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.

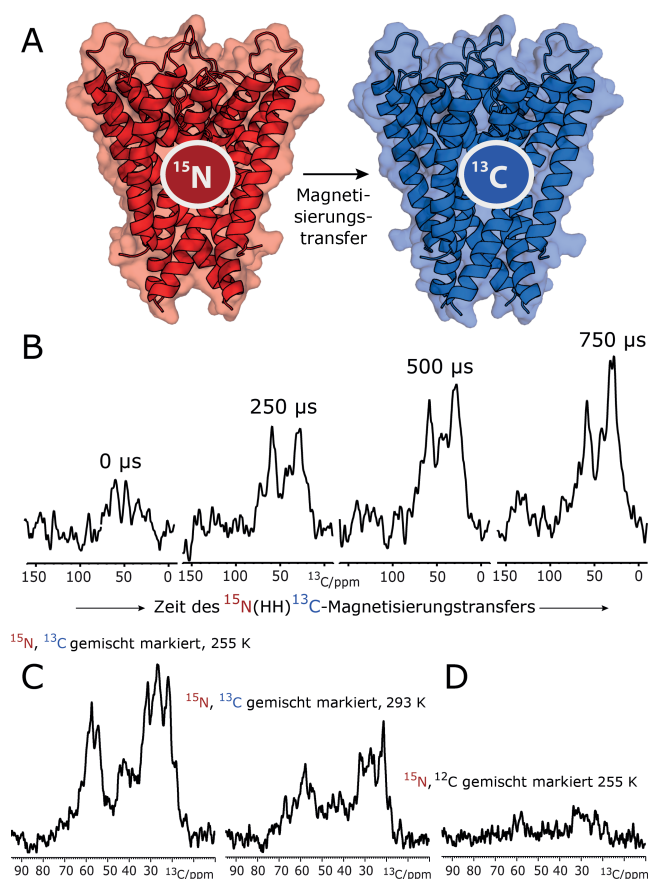


Abbildung 1. SSNMR zeigt, dass KcsA-Kanäle in *E.-coli*-Lipiden aggregieren. A) KcsA-Ballungen können mit äquimolaren Mischungen von ^{15}N und ^{13}C markierten Kanälen und geeigneten ssNMR-Experimenten wie NHHC untersucht werden.^[9a] B) Eine Serie von 1D-NHHC-Experimenten mit steigender ^1H - ^1H -Mischzeit, angewendet auf gemischt markierte Kanäle, zeigt die Präsenz von KcsA-Ballungen. C) Ballungsbildung geschah bei niedriger (255 K) und hoher (293 K) Temperatur. Die Intensität ist bei 293 K geringer aufgrund von geringerer Effizienz des dipolaren Transfers. D) Ohne ^{13}C -Markierung fehlen die Signale nahezu, sodass natürliches ^{13}C vernachlässigt werden kann.

dass KcsA-Kanäle in Ballungen zeitgleich öffnen und dass Kanalballung die Öffnungswahrscheinlichkeit stark erhöht.^[6a] Dagegen zeigten AFM-Studien mit verkürzten KcsA-Kanälen in zwitterionischen Liposomen jedoch, dass offene Kanäle keine Ballungen bilden.^[6b] Wir versuchten, diesen Widerspruch aufzuklären. Wir nahmen Serien von vergleichenden 1D-NHHC-Messungen mit geschlossenen und offenen WT-Kanälen in *E.-coli*-Lipiden auf. Bei diesen Studien war es von entscheidender Bedeutung, mit einem geringen P/L-Verhältnis zu arbeiten, da i) nur dies den Kanälen ausreichend Platz gewähren würde, um potenziell beim Öffnen zu dissoziieren,^[6b] und ii) um zufällige Kanal-Kanal-Kontakte auszuschließen. Da jedoch ein 1D-NHHC-Experiment im P/L-Verhältnis von 1:100 (Abbildung 1) bereits ungefähr einen Tag Messzeit benötigte, waren substanziiell geringe P/L-Verhältnisse mit konventionellen NMR-Methoden nicht möglich. Wir überwandten dieses Problem mithilfe der DNP-Technik, welche die Empfindlichkeit um zwei Größenordnungen erhöhen kann (siehe z. B. Lit. [9b, 14]). Wir präparierten Vesikel mit ^{15}N , ^{13}C gemischt markierten Kanälen und nahmen Ex-

perimente mittels einer 263 GHz/400 MHz-DNP/ssNMR-Installation bei 100 K auf (siehe auch die Hintergrundinformationen). Wir erhielten Signalverstärkungsfaktoren ϵ von 20–55, vergleichbar mit unseren früheren DNP-Anwendungen mit KcsA.^[14c] Diese Verstärkung ermöglichte es uns, mit viel geringeren P/L-Verhältnissen von 1:400 zu arbeiten. So wurde sichergestellt, dass unsere DNP-ssNMR-Experimente Kanal-Kanal-Kontakte in Referenz zum Kanalzustand maßen. Wir maßen zuerst ein DNP-ssNMR-Experiment mit geschlossenen Kanälen (bei pH 7), was die Bildung von Ballungen bestätigte. Danach wuschen wir exakt dieselbe Probenpräparation in saurem Puffer (pH 4), was ein bekanntes Mittel ist, um die Aktivierungspforte von KcsA zu öffnen.^[5,15,16] Überraschenderweise beobachteten wir drastisch erhöhte Signale in NHHC-Experimenten mit geöffneten Kanälen (Abbildung 2A). Wir bestätigten dieses Resultat, indem wir die Kanäle abermals schlossen (pH 7), was wiederum die NHHC-Signale deutlich abschwächte (Abbildung 2B). Somit enthüllen unsere DNP-ssNMR-Experimente in nativen bakteriellen Lipiden, dass die Bildung von Ionenkanalballungen ein reversibler, dynamischer Prozess ist, der mit dem KcsA-Funktionszyklus korreliert. Weiterhin zeigt unsere Studie eindeutig, dass offene Kanäle Ballungen bilden, was frühere Ergebnisse von Molina et al. erklärt.^[6a] Darüber hinaus demonstriert unsere Studie, dass die Öffnung der Aktivierungspforte die Bildung von Ballungen sogar stark stimuliert.

Aber was verursacht den überraschenden Anstieg in Ballungen nach der Kanalöffnung, und wie kommunizieren Kanäle um simultan zu öffnen? Unsere Daten zeigen dass die Kanal-Kanal-Wechselwirkungsfläche durch die Öffnung der Aktivierungspforte moduliert wird. Dies suggeriert sehr stark, dass ein Strukturelement, das an diesem Öffnungsprozess beteiligt ist, auch Teil der Wechselwirkungsfläche ist. Das Hauptereignis bei der Öffnung der Aktivierungspforte ist eine Konformationsänderung der inneren transmembranen (TM2) Helix. Allerdings ist es kaum möglich, dass die TM2-Helix, die sich tief im Inneren von KcsA befindet, ein Teil der Kanal-Kanal-Wechselwirkungsfläche ist. Ein anderes Strukturelement, das den Öffnungsvorgang moduliert, ist die membranassoziierte M0-Helix, gebildet durch die N-terminalen Reste M1–G21.^[17] Tatsächlich ist es viel wahrscheinlicher, dass M0-Helices an der Ballungsbildung beteiligt sind, da diese Helices die am stärksten hervorstehenden Elemente von KcsA in der Membranebene sind.

Wenn der Kanal sich öffnet, durchläuft die M0-Helix eine starke Konformationsänderung, durch welche die hydrophoben M0-Reste in der Membran eingelagert werden und geladene Reste exponiert werden. Dieser Mechanismus wird als „roll-and-stabilize“ bezeichnet.^[17] Die M0-Helix könnte somit ein Hebel sein, um die Ballungsbildung zu modulieren, und wir spekulierten daher, dass diese Helices Teil der Kanal-Kanal-Wechselwirkungsfläche sind.

Um die Kanal-Kanal-Wechselwirkungsfläche im Detail zu studieren, unternahmen wir CGMD-Simulationen mit dem MARTINI-Kraftfeld.^[18] Dieses Kraftfeld bietet die lange zeitliche und große räumliche Skala, die man für Simulationen der Ballungen von Membranproteinen benötigt.^[19] Jedoch wollen wir betonen, dass CGMD-Simulationen nur

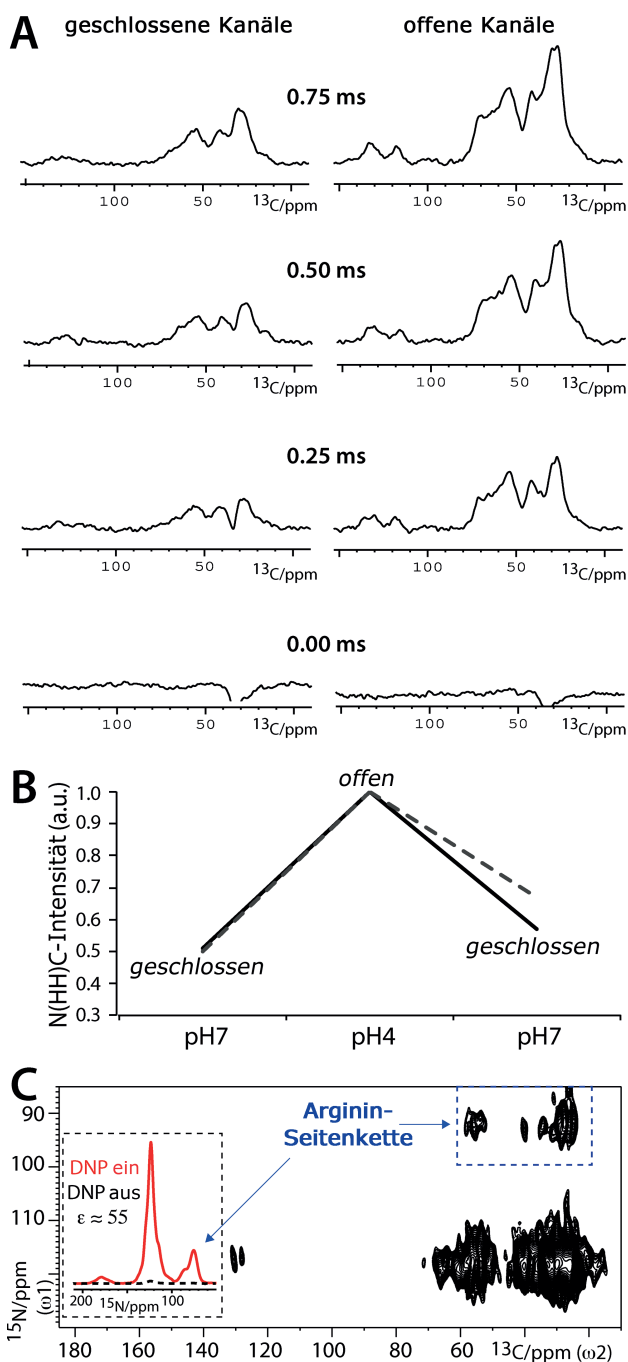


Abbildung 2. DNP-ssNMR-Experimente zur Untersuchung der KcsA-Ballung in Relation zur Kanalfunktion. A) Reihen von 1D-NHHC-Spektren mit geschlossen-leitenden (links) und offen-inaktivierten (rechts) gemischt markierten Kanälen (siehe auch Abbildung S4). Spektren sind normalisiert (siehe die Hintergrundinformationen) und nach steigender ^1H - ^1H -Mischzeit geordnet. B) Vergleich von NHHC-Spektren, gemessen mit 0.75 ms ^1H - ^1H -Mischzeit. Die Spektren wurden anhand der höchsten Intensität an den Signalmaxima bei 27 ^{13}C ppm (schwarze durchgehende Linien) und 54 ^{13}C ppm (grau gestrichelte Linien) normalisiert. Man beachte, dass dieselbe Probe für die Abbildungen 2A–C verwendet wurde. DNP-verstärktes 2D-NHHC-Spektrum, gemessen mit gemischt markierten, geschlossenen KcsA-Kanälen (pH 7). Der schwarz-gestrichelte Einschub illustriert die DNP-Verstärkung von 55. Der blau-gestrichelte Kasten markiert Kanal-Kanal-Kontakte, an denen Arginin-Seitenketten teilnehmen. Um Messzeit zu sparen, wurden die Arg-Signale bei ca. 75 ^{15}N ppm im 2D-NHHC-Spektrum auf ca. 95 ^{15}N ppm zurückgefaltet.

begrenzte Einsichten in solche Ballungen geben können. Zum einen sind solche Simulationen zwangsläufig weniger akkurat als atomistische Simulationen, was zu einer Überschätzung von intermolekularen Wechselwirkungen führen könnte. Zum anderen ist das MARTINI-Kraftfeld beschränkt hinsichtlich Änderungen in der simulierten Umgebung, und Sekundärstrukturänderungen sind beispielsweise nicht möglich. Allerdings heben wir auch hervor, dass eine Überschätzung der Kanal-Kanal-Wechselwirkung ein geringeres Problem wäre, da wir die Bildung von Ballungen experimentell klar bewiesen haben. Überdies zeigen KcsA-Kanäle in *E. coli*-Membranen, in welchen KcsA Ballungen bildet (Abbildungen 1, 2), nur minimale Sekundärstrukturänderungen im Vergleich zu Kristallstrukturen.^[20] Und letztlich sind atomistische Simulationen von Ionenkanalballungen auf den relevanten Skalen nicht realistisch.

Wir simulierten 16 geschlossene KcsA-Kanäle, abgeleitet von pdb 1K4C (umfasst Reste S22-H124), die initial äquidistant in einer großen Membran platziert wurden. Die Membran bestand aus 3280 DOPE-, 944 DOPG- und 480 Cardiolipin-Lipiden, was die Zusammensetzung der inneren *E. coli*-Membran approximiert.^[21] Das P/L-Verhältnis lag bei ungefähr 1:300 (siehe die Hintergrundinformationen für Details der Simulation). Um den Einfluss der M0-Helix auf die Kanalbannung zu erforschen, simulierten wir die Kanäle ohne und mit M0-Helices (Abbildung 3 A,B). Für letzteren Fall wurden M0-Helices mit MODELLER hinzugefügt. Jede Simulation wurde über 37.5 μs berechnet. Tatsächlich zeigten die Simulationen deutlich, dass die M0-Helix die Ballungsbildung moduliert. Ohne die M0-Helix bildeten sich lediglich kleine, dimere oder trimere, Aggregate von Kanälen. Mit der M0-Helix beschleunigte sich die Ballungsbildung jedoch drastisch, da die M0-Helices als flexible „Tentakel“ agieren, die nach anderen Kanälen „fischen“. Bemerkenswerterweise bildeten die Kanäle mit M0 ein engmaschiges Netz von 40 nm Breite, in welchem sich Kanäle verheddern und aus welchem sie nicht einfach entkommen können. Solche massiven Ballungen sind konsistent mit In-vitro- und In-vivo-Messungen, in welchen Ballungen von 50 nm beobachtet wurden.^[6b,8] Kanal-Kanal-Kontakte in diesem Netz sind recht dynamisch (siehe Video S1), und dies ist wahrscheinlich notwendig, sodass die Kanäle auf die Öffnung des Aktivierungspforte reagieren können (Abbildung 2). Man beachte, dass wir die zytoplasmische Domäne (CPD) in den Simulationen nicht berücksichtigt haben, da vorherige Studien gezeigt hatten, dass die CPD nicht an der Ballungsbildung beteiligt ist.^[6a,b] In Übereinstimmung dazu zeigt ein Alignment von WT-KcsA^[22] mit unserem Modell der Kanal-Kanal-Wechselwirkung, dass die CPDs wechselwirkender Kanäle weit voneinander entfernt sind (Abbildung S3).

Die M0 hat auch einen großen Einfluss auf die Kanal-Kanal-Wechselwirkungsfläche. Ohne die M0-Helix (Abbildung 3 C) ist die Wechselwirkungsfläche durch die TM1-Helix dominiert. So wie wir annahmen, trägt hier die TM2-Helix nicht zur Wechselwirkungsfläche bei. In Gegenwart von M0-Helices ist die Kanal-Kanal-Wechselwirkungsfläche durch die untereinander wechselwirkenden M0-Helices dominiert, während die TM1-Helix aus sterischen Gründen nur minimal beiträgt. Weiterhin ist das Verbindungsstück („turret“) zwi-

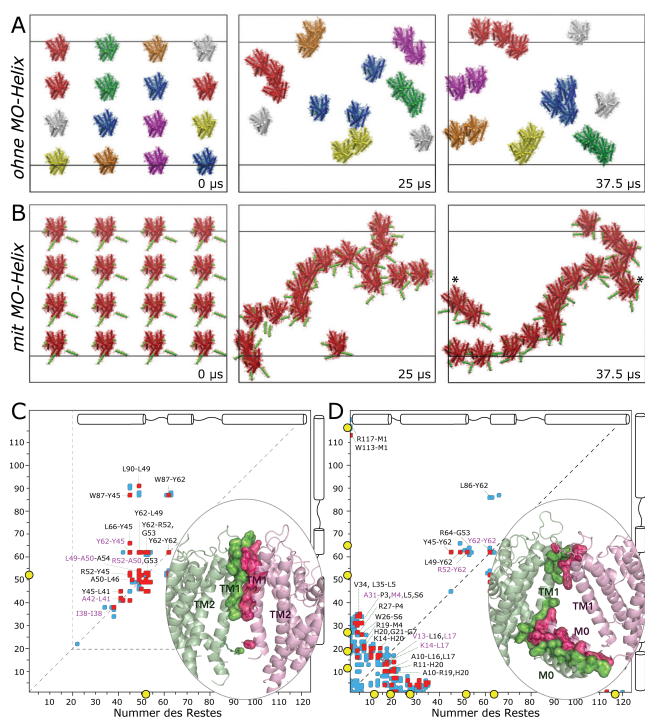


Abbildung 3. Analyse der KcsA-Ballungsbildung mittels CGMD-Simulationen. A) Zeitlich aufgelöstes Verhalten von Kanälen ohne M0-Helix. Kanäle in Ballungen sind in der gleichen Farbe markiert. B) Zeitlich aufgelöstes Verhalten von Kanälen mit M0-Helix (grün). Kanäle, die mit Sternchen markiert sind, ballen sich über die Begrenzung des periodischen Simulationsausschnitts hinweg zusammen. Die Abbildung nach 37.5 μs wurde lateral um 5 nm versetzt. C, D) Kontakt-Diagramme, abgeleitet^[23] aus atomistischen Wechselwirkungsflächen, berechnet über die letzten 7.5 μs der Simulationen. Die Diagramme zeigen Paare von Resten wechselwirkender Kanäle (maximal 5 Å Distanz) ohne (C) und mit (D) M0-Helices. Restepaare, die im Vergleich zum am häufigsten vorkommenden Restepaar, $> 30\%$ und $< 30\%$ populiert waren, wurden mit Rot und Blau hervorgehoben. Die fünf häufigsten Restepaare sind in Magenta markiert. Paare mit einer Population $< 10\%$ wurden nicht berücksichtigt. Gelbe Kreise zeigen Argininreste der Wechselwirkungsfläche. Repräsentative atomistische Wechselwirkungsflächen sind jeweils in den rechten unteren Ecken der Diagramme gezeigt.

schen TM1 und dem Selektivitätsfilter ebenso Teil der Wechselwirkungsfläche (Abbildung 3D). Wir versuchten, dieses Strukturmodell mittels eines 2D-NHHC-DNP-ssNMR-Experiments zu bestätigen. Eine DNP-Verstärkung von $\varepsilon = 55$ ermöglichte die Aufnahme eines 2D-NHHC-Spektrums in lediglich drei Tagen (Abbildung 2C). Während die Auflösung der Rückgrat-Stickstoffatome (100–130 ^{15}N ppm) im 2D-Experiment die Zuordnung spezifischer Kontakte nicht zuließ, konnten wir allerdings sehr starke Korrelationen beobachten, die charakteristisch für Polarisations-transfer von Arginin-Seitenketten (erscheinen bei ca. 75–80 ^{15}N ppm) zu ^{13}C im Rückgrat und in den Seitenketten sind. Diese starken Arginin-Beiträge bekräftigen deutlich die Präsenz der M0-Helix an der Wechselwirkungsfläche (Abbildung 3D). Tatsächlich sind sechs Arg-Reste (R11, R19, R27, R52, R64, R117) an der Wechselwirkungsfläche in Gegenwart der M0-Helix vorhanden, hingegen nur ein einziger

Arg-Rest (R52) in Abwesenheit der M0-Helix. Abgesehen von diesen experimentellen Hinweisen ist es sterisch nahezu unmöglich, dass die weit herausstehenden M0-Helices nicht Teil der Kanal-Kanal-Wechselwirkungsfläche sind.

Man beachte, dass die Anwendung von 800-MHz-DNP^[14c] kaum zusätzlichen Nutzen in dieser Studie gehabt hätte, da wir aus Empfindlichkeitsgründen fast ausschließlich auf 1D-Experimente beschränkt waren. Gleichermäßen konnten wir 2D- oder 3D-Experimente vom N(HH)CC-Typ, die womöglich weitere Details zur Kanal-Kanal-Wechselwirkungsfläche liefern könnten, in unseren stark verdünnten Proben aus Empfindlichkeitsgründen nicht durchführen.

In dieser Studie haben wir die Anatomie der Ballungen des K^+ -Kanals KcsA in nativen bakteriellen Lipiden im Detail analysiert. Mittels DNP-ssNMR-Experimenten in Kombination mit MD-Simulationen konnten wir demonstrieren, dass die Ballung und die Funktion von K^+ -Kanälen in Membranen korreliert, und dies impliziert einen Zusammenhang zwischen Kanallokalisierung und -funktion. Dadurch löst unsere Arbeit einen Widerspruch in der Literatur über KcsA-Ballungen^[6b] und bekräftigt, dass sich KcsA-Kanäle konzentriert öffnen können.^[6a] Erstaunlicherweise enthüllt unsere Studie, dass die M0-Helix ein Schlüsselement der Ballungsbildung, und wahrscheinlich auch der Interkanalkommunikation, ist. In diesem Kontext unterstreicht unsere Studie die Bedeutung eines detaillierten Verständnisses von Ballungen von Membranproteinen, insbesondere da solche Ballungen wohl ubiquitär sind in gedrängten biologischen Membranen.

Danksagung

Wir danken für finanzielle Unterstützung durch die NWO (700.26.121, 700.10.443, 723.014.003)

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenskonflikte vorliegen.

Stichwörter: Dynamische Kernpolarisation · Festkörper-NMR-Spektroskopie · Gekoppelte Schaltprozesse · Ionenkanäle · KcsA

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 13222–13227
Angew. Chem. **2017**, *129*, 13222–13409

- [1] a) F. Spira, N. S. Mueller, G. Beck, P. von Olshausen, J. Beig, R. Wedlich-Soldner, *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14*, 640–648; b) P. Sharma, R. Varma, R. C. Sarasij, Ira, K. Goussset, G. Krishnamoorthy, M. Rao, S. Mayor, *Cell* **2004**, *116*, 577–589.
- [2] a) S. O. Marx, J. Gaburjakova, M. Gaburjakova, C. Henrikson, K. Ondrias, A. R. Marks, *Circ. Res.* **2001**, *88*, 1151–1158; b) M. F. Navedo, E. P. Cheng, C. Yuan, S. Votaw, J. D. Molkenstin, J. D. Scott, L. F. Santana, *Circ. Res.* **2010**, *106*, 748–756; c) J. J. Sieber, K. I. Willig, C. Kutzner, C. Gerding-Reimers, B. Harke, G. Donnert, B. Rammner, C. Eggeling, S. W. Hell, H. Grubmüller, T. Lang, *Science* **2007**, *317*, 1072–1076.

- [3] a) S. T. Lim, D. E. Antonucci, R. H. Scannevin, J. S. Trimmer, *Neuron* **2000**, 25, 385–397; b) K. M. O'Connell, R. Loftus, M. M. Tamkun, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, 107, 12351–12356; c) Y. Horio, H. Hibino, A. Inanobe, M. Yamada, M. Ishii, Y. Tada, E. Satoh, Y. Hata, Y. Takai, Y. Kurachi, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 12885–12888.
- [4] a) B. Naundorf, F. Wolf, M. Volgushev, *Nature* **2006**, 440, 1060–1063; b) S. A. Freeman, A. Desmazieres, D. Fricker, C. Lubetzki, N. Sol-Foulon, *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, 73, 723–735.
- [5] G. Yellen, *Nature* **2002**, 419, 35–42.
- [6] a) M. L. Molina, F. N. Barrera, A. M. Fernandez, J. A. Poveda, M. L. Renart, J. A. Encinar, G. Riquelme, J. M. Gonzalez-Ros, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 18837–18848; b) A. Sumino, D. Yamamoto, M. Iwamoto, T. Dewa, S. Oiki, *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, 5, 578–584; c) M. Yanagisawa, M. Iwamoto, A. Kato, K. Yoshikawa, S. Oiki, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 11774–11779.
- [7] A. M. Giudici, M. L. Molina, J. L. Ayala, E. Montoya, M. L. Renart, A. M. Fernandez, J. A. Encinar, A. V. Ferrer-Montiel, J. A. Poveda, J. M. Gonzalez-Ros, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2013**, 1828, 193–200.
- [8] J. Hegermann, J. Overbeck, H. Schrempf, *Microbiology* **2006**, 152, 2831–2841.
- [9] a) M. Eitzkorn, A. Bockmann, A. Lange, M. Baldus, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 14746–14751; b) J. Maciejko, M. Mehler, J. Kaur, T. Lieblein, N. Morgner, O. Ouari, P. Tordo, J. Becker-Baldus, C. Glaubitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 9032–9043.
- [10] M. Weingarh, G. Bodenhausen, P. Tekely, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 13937–13939.
- [11] L. G. Cuello, J. G. Romero, D. M. Cortes, E. Perozo, *Biochemistry* **1998**, 37, 3229–3236.
- [12] A. van Dalen, S. Hegger, J. A. Killian, B. de Kruijff, *FEBS Lett.* **2002**, 525, 33–38.
- [13] D. M. Cortes, E. Perozo, *Biochemistry* **1997**, 36, 10343–10352.
- [14] a) V. S. Bajaj, M. L. Mak-Jurkauskas, M. Belenky, J. Herzfeld, R. G. Griffin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 9244–9249; b) 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; c) E. J. Koers, E. A. van der Crujisen, M. Rosay, M. Weingarh, A. Prokofyev, C. Sauvee, O. Ouari, J. van der Zwan, O. Pongs, P. Tordo, W. E. Maas, M. Baldus, *J. Biomol. NMR* **2014**, 60, 157–168; d) M. A. Voinov, D. B. Good, M. E. Ward, S. Milikisiyants, A. Marek, M. A. Caporini, M. Rosay, R. A. Munro, M. Ljumovic, L. S. Brown, V. Ladizhansky, A. I. Smirnov, *J. Phys. Chem. B* **2015**, 119, 10180–10190; e) S. Y. Liao, M. Lee, T. Wang, I. V. Sergeev, M. Hong, *J. Biomol. NMR* **2016**, 64, 223–237; f) E. Lehnert, J. Mao, A. R. Mehdipour, G. Hummer, R. Abele, C. Glaubitz, R. Tampe, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 13967–13974; g) J. Becker-Baldus, C. Bamann, K. Saxena, H. Gustmann, L. J. Brown, R. C. Brown, C. Reiter, E. Bamberg, J. Wachtveitl, H. Schwalbe, C. Glaubitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, 112, 9896–9901; h) M. Kaplan, S. Narasimhan, C. de Heus, D. Mance, S. van Doorn, K. Houben, D. Popov-Celeketic, R. Damman, E. A. Katrukha, P. Jain, W. J. C. Geerts, A. J. R. Heck, G. E. Folkers, L. C. Kapitein, S. Lemeer, P. M. P. V. E. Henegouwen, M. Baldus, *Cell* **2016**, 167, 1241–1251.
- [15] M. Weingarh, E. A. van der Crujisen, J. Ostmeier, S. Lievestro, B. Roux, M. Baldus, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 2000–2007.
- [16] E. A. van der Crujisen, A. V. Prokofyev, O. Pongs, M. Baldus, *Biophys. J.* **2017**, 112, 99–108.
- [17] M. Iwamoto, S. Oiki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, 110, 749–754.
- [18] D. H. de Jong, G. Singh, W. F. D. Bennett, C. Arnarez, T. A. Wassenaar, L. V. Schafer, X. Periole, D. P. Tieleman, S. J. Marrink, *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, 9, 687–697.
- [19] a) G. van den Bogaart, K. Meyenberg, H. J. Risselada, H. Amin, K. I. Willig, B. E. Hubrich, M. Dier, S. W. Hell, H. Grubmuller, U. Diederichsen, R. Jahn, *Nature* **2011**, 479, 552–555; b) X. Periole, A. M. Knepp, T. P. Sakmar, S. J. Marrink, T. Huber, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 10959–10965.
- [20] E. A. van der Crujisen, D. Nand, M. Weingarh, 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.
- [21] R. P. Huijbregts, A. I. de Kroon, B. de Kruijff, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2000**, 1469, 43–61.
- [22] S. Uysal, V. Vasquez, V. Tereshko, K. Esaki, F. A. Fellouse, S. S. Sidhu, S. Koide, E. Perozo, A. Kossiakoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 6644–6649.
- [23] T. A. Wassenaar, K. Pluhackova, R. A. Bockmann, S. J. Marrink, D. P. Tieleman, *J. Chem. Theory Comput.* **2014**, 10, 676–690.

Manuskript erhalten: 5. Juni 2017

Veränderte Fassung erhalten: 29. Juni 2017

Akzeptierte Fassung online: 7. Juli 2017

Endgültige Fassung online: 10. August 2017