



LEGO-NMR: eine Methode zur Visualisierung einzelner Untereinheiten in großen heteromeren Komplexen**

Markus Mund, Jan H. Overbeck, Janina Ullmann und Remco Sprangers*

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) zeichnet sich durch die Möglichkeit aus, Biomoleküle mit atomarer Auflösung in einem fast-natürlichen Milieu zu analysieren. Üblicherweise können aber nur Moleküle mit Gewichten unter 20 kDa auf Struktur, Wechselwirkungen und Dynamik untersucht werden. In den letzten Jahren wurde diese Grenze aber durch TROSY-Techniken,^[1] das Deuterieren von Proteinen^[2] und die gezielte Markierung von Methylgruppen^[3] deutlich erhöht. So konnten Komplexe von weit über 100 kDa detailliert untersucht^[4] und funktionelle Besonderheiten großer molekularer Maschinerien aufgeklärt werden.^[5]

Oftmals wurden dabei hochsymmetrische Molekülkomplexe untersucht, da diese vergleichsweise einfach herzustellen sind und einfache NMR-Spektren aufweisen, in denen alle Untereinheiten zu identischen Signalen führen.^[5a] Für diejenigen großen unsymmetrischen Komplexe, welche durch Koexpression aller Untereinheiten in *E. coli* produziert werden können,^[6] sind die resultierenden NMR-Spektren durch die Vielzahl der Resonanzsignale jedoch nicht vollständig auszuwerten. In wenigen Fällen konnte dieses Problem umgangen werden, indem der Komplex *in vitro* aus einzeln aufgereinigten, NMR-aktiven und NMR-inaktiven Untereinheiten rekonstituiert wurde.^[5b,c,h] Diese Strategie ist allerdings nicht allgemein anwendbar. Dadurch bleiben die meisten eukaryotischen Systeme, welche deutlich komplexer als ihre bakteriellen und archaebakteriellen Gegenstücke sind, für die hochauflösende NMR-Spektroskopie unzugänglich.

[*] M. Mund,^[4] J. H. Overbeck, J. Ullmann, Dr. R. Sprangers
Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie
Spemannstraße 35, 72076 Tübingen (Deutschland)
E-Mail: remco.sprangers@tuebingen.mpg.de

[†] Derzeitige Adresse: European Molecular Biology Laboratory
Meyerhofstraße 1, 69117 Heidelberg (Deutschland)

[**] Wir danken Silke Wiesner für Hinweise und Ratschläge zum Manuscript. Wir danken Ancilla Neu, Lisa Srittmatter und der gesamten Arbeitsgruppe für konstruktive Diskussionen, Hanna Mund für Hilfe bei der Übersetzung und Dr. Felix für Unterstützung. Diese Arbeit wurde unterstützt durch die Max-Planck-Stiftung und einen Marie Curie Reintegration Grant (FP7/2007-2013, grant agreement no. 239164) an R.S.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201304914> zu finden.

© 2013 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.

Wir stellen hier eine Methode zur schrittweisen Koexpression von großen unsymmetrischen Komplexen vor, welche die Vorteile von In-vivo-Rekonstitution und partieller Isotopenmarkierung zur Senkung der spektralen Komplexität kombiniert. *E. coli* wird dabei mit zwei Plasmiden mit unterschiedlichen Promotorsystemen transformiert, mit denen unabhängig voneinander die Proteinexpression induziert werden kann. Hierdurch ist es möglich die Synthese einer Gruppe von Proteinen in NMR-aktivem Medium (Stufe 1) zu starten, und anschließend eine zweite Gruppe von Proteinen in NMR-inaktivem Medium (Stufe 2) zu exprimieren (Abbildung 1A). Durch die Expression aller Proteine in derselben *E. coli*-Zelle wird der Komplex in einer zellulären Umgebung zusammengesetzt, was verhindert, dass einzeln unlösliche Untereinheiten aggregieren. Wir benennen diese Methode zum Markieren, Exprimieren und Generieren von Oligomeren für NMR als „LEGO-NMR“ („label, express, and generate oligomers“ for NMR).

Die LEGO-Methode basiert auf strikt kontrollierbaren DNA-Promotoren, sodass der erste Promotor, welcher die Stufe 1 der Expression steuert, in Stufe 2 komplett inaktiv ist, und der zweite Promotor sich umgekehrt verhält. In LEGO-Methoden A1 und A2 (Abbildung S1) wird Stufe 1 durch einen Arabinose-induzierbaren araBAD-Promotor und Stufe 2 durch einen IPTG-induzierbaren T7-Promotor kontrolliert.^[7] Der araBAD-Promotor wird in Stufe 2 durch die im Medium vorhandene Glucose effektiv deaktiviert.^[8] LEGO-Methode B basiert auf einem neuartigen Drei-Promotor-System, in welchem in Stufe 1 die Proteinexpression von einem T7-Promotor und in Stufe 2 von einem araBAD-Promotor erfolgt. In Stufe 2 wird dann die T7-Expression durch ein drittes Plasmid mit einem Rhamnose-induzierbaren Promotor aktiv unterdrückt.^[9] Diese Hemmung ist notwendig, da sonst die Induktion durch den T7-Promotor auch nach dem Entfernen von IPTG für mehr als vier Stunden anhalten würde.^[7a]

Um das LEGO-NMR-Konzept zu etablieren, analysieren wir zwei verschiedene LSm-Komplexe des mRNA-Abbaus und mRNA-Spleißens. Die zwei Komplexe LSm1–7^[10] (mit den LSm-Proteinen 1–7) und LSm2–8^[11] (mit den LSm-Proteinen 2–8) enthalten je sieben verschiedene Proteine in definierter Anordnung.^[11b,12] Da die meisten LSm-Proteine allein unlöslich sind, können weder LSm1–7 noch LSm2–8 effizient *in vitro* aus einzeln aufgereinigten Untereinheiten rekonstituiert werden.^[13] Andererseits führt die Koexpression der verschiedenen Komplexe durch die Effizienz der Rekonstruktion in zellulärem Umfeld zu homogenen NMR-Proben (Abbildung 1B). Aufgrund der großen Zahl an Resonanzsignale (649 erwartete, voneinander verschiedene Signale der Rückgrat-Amide) sind die resultierenden NMR-

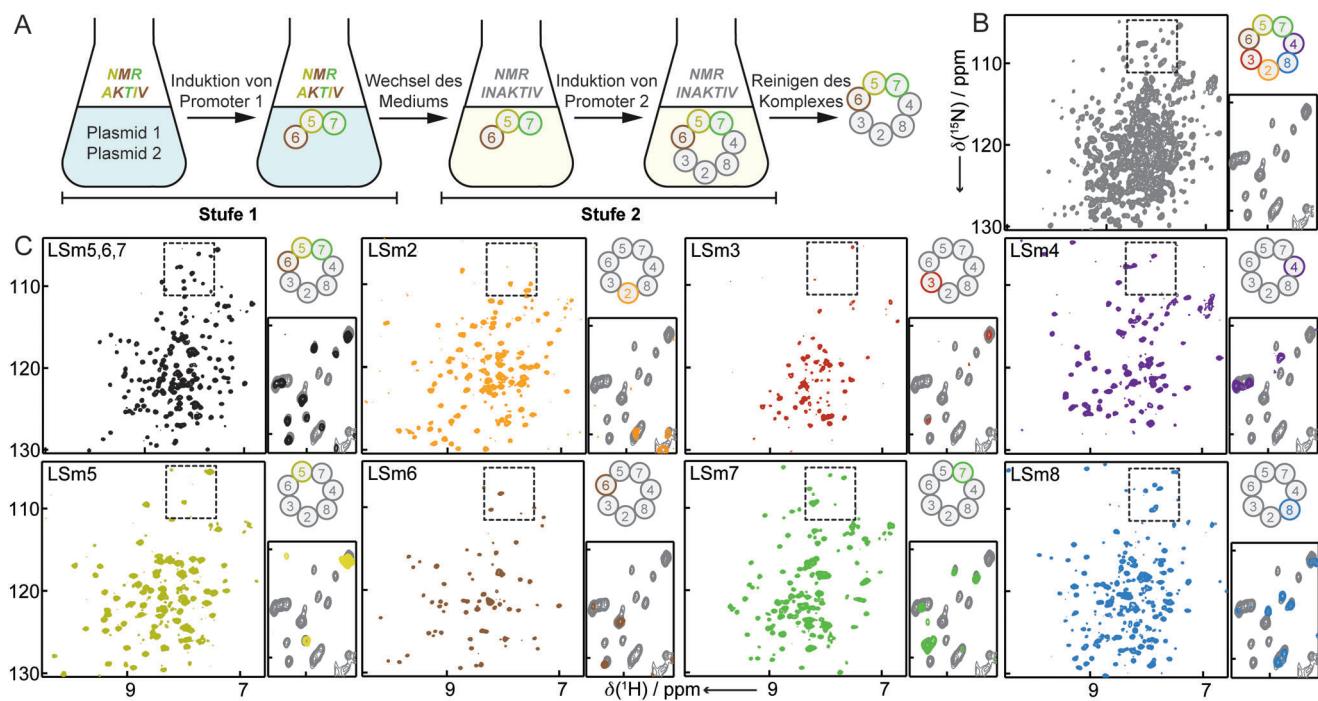


Abbildung 1. Prinzip von LEGO-NMR. A) Dargestellt ist Methode A1 (Tabelle S2, Abbildung S1). In Stufe 1 wächst *E. coli* in einem NMR-aktiven Medium, die Proteinsynthese wird von Plasmid 1 induziert und LSm5, LSm6 und LSm7 werden NMR-aktiv exprimiert. In Stufe 2 werden die Zellen in ein NMR-inaktives Medium überführt und die Proteinsynthese von Plasmid 2 gestartet, wodurch die NMR-inaktiven LSm2, LSm3, LSm4 und LSm8 produziert werden. Durch die Fusion einer einzelnen Untereinheit mit einer Affinitätsmarkierung wird der gesamte Komplex direkt isoliert und bis zur Homogenität aufgereinigt. NMR-aktive Untereinheiten sind farbig, NMR-inaktive Untereinheiten grau dargestellt. B) ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektrum (grau) des komplett NMR-aktiven LSm2-8-Komplexes. Besonders in der zentralen Region überlagern sehr viele Resonanzsignale, was die Auswertung deutlich erschwert. C) Oben links: LEGO- ^1H - ^{15}N -NMR-Spektrum (schwarz) des LSm2-8-Komplexes, in dem LSm5, LSm6 und LSm7 NMR-aktiv und LSm2, LSm3, LSm4 und LSm8 NMR-inaktiv sind. Andere Felder: LEGO- ^1H - ^{15}N -NMR-Spektren des LSm2-8-Komplexes mit einzelnen NMR-aktiven Untereinheiten im ansonsten NMR-inaktiven Komplex. Die Resonanzen entsprechen einem Teil der Signale des komplett markierten LSm2-8-Komplexes (siehe Vergrößerungen).

Spektren durch Signal-Überlappung allerdings deutlich verschlechtert und nicht exakt auszuwerten (Abbildung 1B). Die LSm-Komplexe stellen daher ein geeignetes Beispiel eukaryotischer Proteinkomplexe dar, die derzeit für die hochauflösende NMR-Spektroskopie unzugänglich sind.

Um die spektrale Überlappung um einen Faktor ≈ 2 zu reduzieren, markierten wir LSm5, LSm6 und LSm7 mit ^{15}N in Stufe 1, und exprimierten anschließend LSm2, LSm3, LSm4 und LSm8 in Stufe 2 in NMR-inaktivem Medium. Das resultierende Spektrum des LSm2-8-Komplexes zeigt nur LSm5, LSm6 und LSm7 und ist deutlich vereinfacht (Abbildung 1C, oben links). Wie erwartet überlagern die Resonanzsignale sehr gut mit einem Teil der Signale des vollständig NMR-aktiven LSm2-8-Komplexes. Dadurch sind die Signale der Proteine LSm5, LSm6 oder LSm7 im gesamten LSm2-8-Komplex eindeutig zu identifizieren.

Um die Leistungsfähigkeit der sequentiellen Koexpressionsstrategie weiter zu testen, erzeugten wir sieben verschiedene NMR-Proben des LSm2-8-Komplexes, in denen je nur ein einziges LSm-Protein in Stufe 1 mit ^{15}N markiert und die übrigen sechs LSm-Proteine NMR-inaktiv in Stufe 2 exprimiert wurden (Abbildung 1C). Die sieben resultierenden Spektren ermöglichen die eindeutige Identifizierung der Resonanzen, die jedem der einzelnen LSm-Proteine im LSm2-8-Komplex entsprechen. Somit konnte eine Vereinfachung

ung von bis zu 89 % (74 erwartete Amidsignale im LSm6-LEGO-Spektrum) erreicht werden. Unser Ansatz ermöglicht also, die komplizierten Spektren des heteroheptameren Komplexes in sieben deutlich vereinfachte Teilspektren aufzuspalten. Gleichzeitig ergibt die Überlagerung der sieben NMR-Spektren, in denen je nur ein LSm-Protein markiert ist, das Spektrum des komplett markierten LSm2-8-Komplexes (Abbildung S2). Es ist bemerkenswert, dass die in Stufe 1 in deuterierter Form produzierten Proteine zu Beginn von Stufe 2 effektiv reprotoniert werden, bevor die Untereinheiten in den Komplex integriert werden. Damit werden (Rückfaltungs-)Protokolle zur Reprotonierung der Rückgrat-Amidgruppen (Abbildung S3) in LSm2-8 unnötig.

LSm2-8 ist Teil des U6-RNPs, in dem es mit dem 3'-Ende der U6-snRNA wechselwirkt.^[11a,14] Um festzustellen, welche Untereinheiten des LSm2-8-Komplexes das RNA-Substrat binden, verwendeten wir NMR-Titrationsexperimente mit LSm2-8-LEGO-Komplexen, die entweder LSm2, 3, 4 und 8 (Abbildung S4A) oder LSm5, 6 und 7 (Abbildung S4B) in einem ansonsten NMR-inaktiven Hintergrund enthielten. In beiden Komplexen führte die RNA-Bindung zu deutlichen Änderungen der chemischen Verschiebungen. Interessanterweise zeigen die LEGO-Spektren mit je einer markierten Untereinheit (Abbildung 1C), dass alle sieben Untereinheiten an der RNA-Bindung beteiligt sind (Abbildung S4A,B),

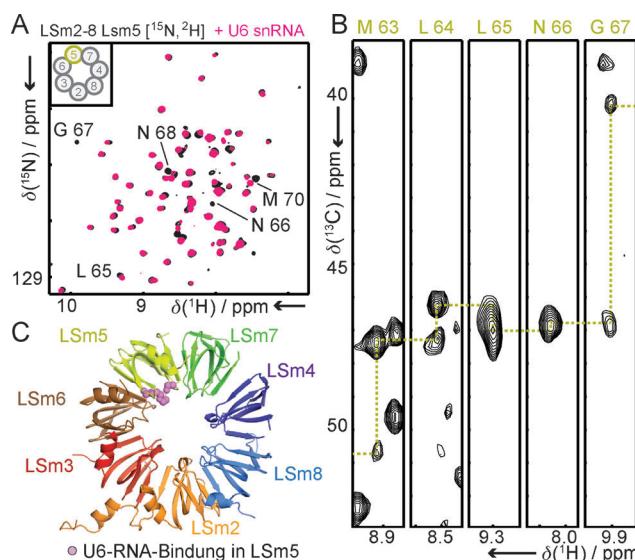


Abbildung 2. Zuordnung von LSm5 im LSm2-8-Komplex. A) LSm5 in LSm2-8 vor (schwarz) und nach (pink) Zugabe des 3'-Fragments der U6-snRNA. B) LSm5-Resonanzstreifen in einem HNCA-Spektrum des komplett markierten LSm2-8-Komplexes. Die Streifen konnten auf Grundlage des LSm5-LEGO-NMR-Spektrums (A und Abbildung 1C) ausgewählt werden. (C) Die LSm5-Reste mit den größten Veränderungen der chemischen Verschiebungen nach Zugabe der U6-snRNA sind im Modell von LSm2-8 als rosafarbene Kugeln dargestellt.

da Signale aller LSm-Proteine durch die Interaktion mit RNA veränderte chemische Verschiebungen aufweisen. Um die verbleibende spektrale Überlappung aufzulösen, führten wir ein RNA-Bindungsexperiment mit einem LSm2-8-Komplex, in dem nur LSm5 markiert ist, durch (Abbildung 2A). Anschließend kombinierten wir Daten des bereits zugeordneten LSm657-Komplexes,^[13a] das LSm5-LEGO-Spektrum (Abbildung 1C) und ein HNCA-Spektrum des vollständig ²H, ¹³C, ¹⁵N-markierten LSm2-8-Komplexes (Abbildung 2B), um diejenigen Reste von LSm5 in LSm2-8 zuzuordnen, die an

der RNA-Bindung beteiligt sind. Hierbei war von Nutzen, dass wir die LSm5-Resonanzsignale im HNCA-Spektrum des komplett markierten LSm2-8-Komplexes auswählen konnten, um damit die Zahl der erwarteten Resonanz-Streifen von 649 auf 77 zu reduzieren und den Zuordnungsvorgang deutlich zu vereinfachen. Dadurch konnten wir zeigen, dass sich die Reste, deren chemische Verschiebungen sich durch die Bindung der U6-snRNA am stärksten verändern, in der Schleife 5 von LSm5 befinden (Abbildung 2C). Diese Schleife verbindet die β-Stränge 4 und 5 in der LSm-Faltung und kleidet die zentrale Pore des LSm-Ringes aus. Da die von uns verwendete RNA aus 9 Basen bestand und alle LSm-Proteine an der RNA-Wechselwirkung beteiligt sind (Abbildung S4), deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass sich die RNA-Bindungsstelle an der zentralen Pore befindet. Zusätzliche Informationen, um diese Beobachtung zu stützen, kann durch die Resonanzzuordnung der anderen LSm-Proteine im LSm2-8-Komplex auf vergleichbarem Weg erhalten werden. Interessanterweise wurde für den eukaryotischen Sm-Komplex,^[15] den archaebakteriellen LSm-Komplex^[16] und den Hfq-Komplex^[17] bereits gezeigt, dass sie ebendiese Region zur RNA-Bindung nutzen. Dies deutet darauf hin, dass die Bindungsstelle in den eukaryotischen LSm-Komplexen konserviert ist.

Methyl-TROSY-Spektroskopie ist hervorragend geeignet um supramolekulare Komplexe zu analysieren, welche für Rückgrat-basierte TROSY-Spektroskopie unzugänglich sind. Um die Integration von ϵ -¹H-¹³C-Methylmarkierung von Methioninresten bei LEGO-NMR zu etablieren, verwendeten wir den heteroheptameren LSm1-7-Komplex, dessen ¹H-¹⁵N-TROSY-Spektren von schlechterer Qualität sind als die des LSm2-8-Komplexes (Abbildung S5). Die Methionin-Methylspektren des vollständig Methionin-markierten LSm1-7-Komplexes weisen viele gut vereinzelte Resonanzsignale und eine Region mit starker spektraler Überlappung auf (Abbildung 3A, oben links). Um diese Überlappung zu vermeiden und die gut vereinzelten Signale den entsprechenden LSm-Proteinen zuzuweisen, stellten wir sieben

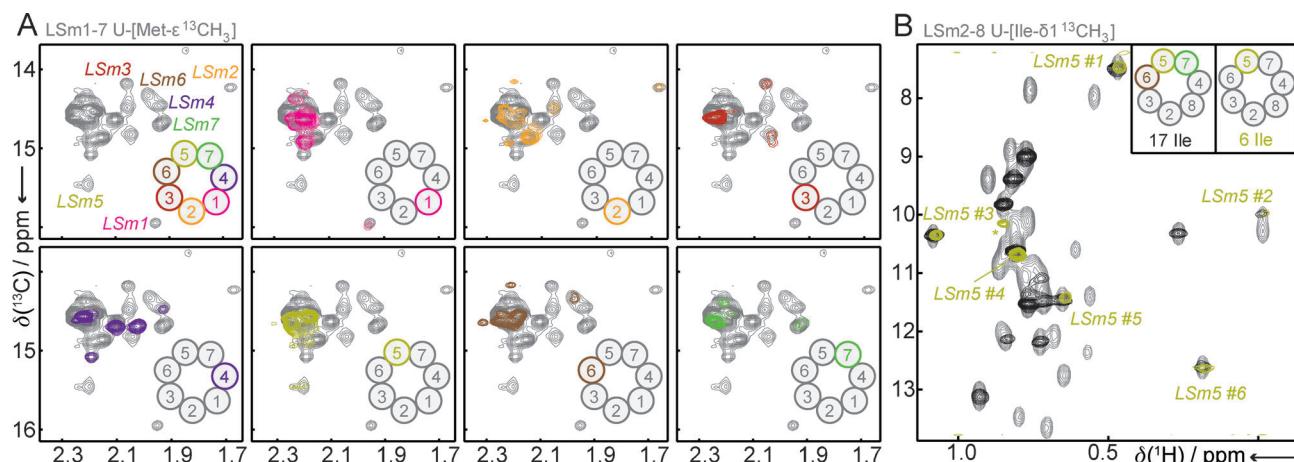


Abbildung 3. Methylgruppen-Markierung. A) Methionin-Methylgruppen-Spektrum des LSm1-7-Komplexes. Das obere linke Feld zeigt das Methyl-TROSY-Spektrum des komplett markierten Komplexes. Das Spektrum kann in sieben vereinfachte Teilspektren aufgespalten werden, die nur ein einzelnes NMR-aktives LSm-Protein enthalten (andere Felder). B) Methyl-TROSY-Spektrum des Ile-δ1-¹³CH₃-markierten LSm2-8-Komplexes. Das Spektrum des vollständig markierten Komplexes (grau) wird durch Markierung nur von LSm5, 6 und 7 (schwarz) oder nur von LSm5 (oliv) vereinfacht.

LEGO-NMR-Proben von LSm1–7 her. In jeder waren die Methioninreste eines einzeln LSm-Proteins markiert, und alle anderen 6 LSm-Proteine NMR-inaktiv. Die Methyl-TROSY-Spektren dieser hetero-heptameren Komplexe ermöglichen die eindeutige Zuordnung der Signale zu den einzelnen LSm-Proteinen (Abbildung 3 A). Die genaue Zuordnung der Resonanzen zu den entsprechenden Methioninresten kann durch gezielte Mutationen erhalten werden.^[5a, 18] Des Weiteren verminderten diese einzelmarkierten LSm1–7-Komplexe das Problem spektraler Überlappung deutlich. Methionin-Methyl-TROSY-Spektroskopie ist also vollständig kompatibel mit der LEGO-NMR-Methode, und bietet hochauflösende Spektren für Komplexe, welche nicht mit ^1H - ^{15}N -basierter TROSY-Spektroskopie analysiert werden können. Hierzu wurde kürzlich gezeigt, dass Methionin-Methylgruppen exzellente Sonden für molekulare Wechselwirkungen sind.^[19]

Neben Methionin-Methylgruppen wird Methyl-TROSY-Spektroskopie oft mithilfe isotopenmarkierter Methylgruppen von Isoleucin-, Leucin-, Valin-^[20] und Alaninresten^[21] durchgeführt. Im Gegensatz zur Methionin-Markierung werden diese Methylgruppen in das Protein durch die Verstoffwechselung spezieller Vorstufenmoleküle in *E. coli* eingebracht. Für Isoleucin-Reste ist dazu Glucose im Medium vornötigen, da hierdurch durch Katabolit-Repression Stoffwechselwege gehemmt werden, durch die ansonsten α -Ketobuttersäure abgebaut würde.^[22] Stufe 1 im Protokoll A1, welches zur Stickstoff- und Methioninmarkierung verwendet wurde (Abbildung S1, Tabelle S2), basiert auf Glycerin als Kohlenstoffquelle und kann deswegen nicht zum Markieren von Isoleucinen genutzt werden. Um einzelne Untereinheiten mit Isoleucin zu markieren, verwenden wir Protokoll A2 (in dem die NMR-aktive Markierung erst in Stufe 2 geschieht) oder Protokoll B (in welchem ein Arabinose-induzierbarer Promotor erst in Stufe 2 zum Einsatz kommt; Abbildung S1).

Die hohe spektrale Qualität bei vollständiger Isoleucin- $\delta 1$ -Markierung unterstreicht, dass Methylgruppen-TROSY-NMR für Komplexe mit hohem Molekulargewicht gut geeignet ist (Abbildung 3 B, grau). Wir nutzten anschließend Protokoll B, um einen „halb“ markierten LSm2–8-Komplex mit NMR-aktiven Isoleucin- $\delta 1$ -Methylgruppen in LSm5, LSm6 und LSm7 herzustellen (Abbildung 3 B, schwarz). Ebenso wie in den ^1H - ^{15}N -basierten Spektren (Abbildung 1 C) können die Resonanzen der markierten Proteine eindeutig identifiziert werden. Für die 17 Isoleucin-Reste in LSm5, LSm6 und LSm7 werden 16 gut vereinzelte Resonanzsignale im Spektrum beobachtet. Im nächsten Schritt verwendeten wir Protokoll A2 zur Herstellung eines LSm2–8-Komplexes, in dem nur LSm5 NMR-aktiv ist (Abbildung 3 B, oliv). Das resultierende HMQC-Spektrum zeigt sechs einzelne Resonanzen, die den sechs Isoleucinresten in LSm5 entsprechen.

In den beschriebenen Experimenten wurde ausschließlich ein Teil des Komplexes isotopenmarkiert, wohingegen die restlichen Untereinheiten NMR-inaktiv waren. Es ist allerdings ebenfalls möglich, mehrere Markierungsstrategien für die verschiedenen Untereinheiten anzuwenden. Dazu stellten wir einen vollständig ^1H - ^{15}N -markierten LSm2–8-Komplex her, dessen Untereinheiten LSm2, 3, 4 und 8 ϵ - ^1H - ^{13}C -Methyl-Methionin-markiert und LSm5, 6 und 7 $\delta 1$ - ^1H - ^{13}C -Isoleucin-

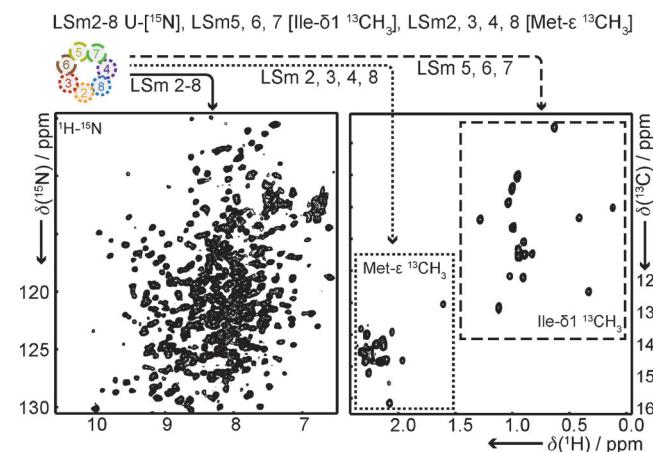


Abbildung 4. Gemischte ^{15}N - ϵ - ^1H , ^{13}C -Methyl-Methionin- und $\delta 1$ - ^1H , ^{13}C -Methyl-Isoleucin-Markierung von LSm2–8. Das ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektrum (links) zeigt alle Untereinheiten des Komplexes (siehe Abbildung 1 B). LSm2, 3, 4 und 8 sind an Methionin-Resten markiert (siehe Abbildung 3 A, welche die Methionin-Methylgruppen von LSm1–7 zeigt). LSm5, 6 und 7 sind an Isoleucin-Resten markiert (siehe Abbildung 3 B).

markiert sind (Abbildung 4). Weil die Methylgruppen von Methionin- und Isoleucin-Resten spektral getrennt sind, können mit diesem Ansatz mehrere NMR-Parameter von verschiedenen Teilen eines großen Komplexes gleichzeitig und unabhängig voneinander erfasst werden.

NMR-Studien von großen und unsymmetrischen Komplexen sind erheblich erschwert durch schwierige Probenherstellung und spektrale Überlappung aufgrund der Vielzahl verschiedener Resonanzsignale. Wir führen hier eine Strategie der sequentiellen Koexpression ein, welche beide Probleme gleichzeitig angeht. Am Beispiel der LSm1–7- und LSm2–8-Komplexe zeigen wir, dass höchst homogene NMR-Proben direkt hergestellt werden können, die nur eine NMR-aktive Untereinheit enthalten. Es ist zu betonen, dass unsere Strategie die Isotopenmarkierung sowohl von Rückgrat-Amidgruppen als auch von Seitenketten-Methylgruppen ermöglicht. LEGO-NMR ist daher gut geeignet für Experimente an großen unsymmetrischen Komplexen wie eukaryotischen Systemen, welche im Moment für detaillierte NMR-Studien nicht zugänglich sind. Im Hinblick darauf ist anzumerken, dass circa 50 % der Komplexe in der PDB mit drei oder mehr verschiedenen Untereinheiten in *E. coli* exprimiert wurden, was die weitreichenden Anwendungsmöglichkeiten unserer Methode unterstreicht.

Eingegangen am 7. Juni 2013
Online veröffentlicht am 14. August 2013

Stichwörter: Isotopenmarkierung · LSm-Komplexe · Methyl-TROSY · NMR-Spektroskopie · Proteinstruktur

[1] a) K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wuthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 12366–12371; b) V. Tugarinov, P. M. Hwang, J. E. Ollerenshaw, L. E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 10420–10428.

[2] M. Sattler, S. W. Fesik, *Structure* **1996**, 4, 1245–1249.

- [3] V. Tugarinov, V. Kanelis, L. E. Kay, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 749–754.
- [4] R. Sprangers, A. Velyvis, L. E. Kay, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 697–703.
- [5] a) R. Sprangers, A. Gribun, P. M. Hwang, W. A. Houry, L. E. Kay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 16678–16683; b) R. Sprangers, L. E. Kay, *Nature* **2007**, *445*, 618–622; c) H. Kato, H. van Ingen, B. R. Zhou, H. Feng, M. Bustein, L. E. Kay, Y. Bai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 12283–12288; d) T. L. Religa, R. Sprangers, L. E. Kay, *Science* **2010**, *328*, 98–102; e) A. Velyvis, Y. R. Yang, H. K. Schachman, L. E. Kay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 8815–8820; f) I. Gelis, A. M. Bonvin, D. Keramisanou, M. Koukaki, G. Gouridis, S. Karamanou, A. Economou, C. G. Kalodimos, *Cell* **2007**, *131*, 756–769; g) R. Rosenzweig, S. Moradi, A. Zarrine-Afsar, J. R. Glover, L. E. Kay, *Science* **2013**, *339*, 1080–1083; h) M. Audin, G. Dorn, S. A. Fromm, K. Reiss, S. Schütz, M. K. Vorländer, R. Sprangers, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8312–8316.
- [6] W. Selleck, R. Howley, Q. Fang, V. Podolny, M. G. Fried, S. Buratowski, S. Tan, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 695–700.
- [7] a) D. S. Burz, K. Dutta, D. Cowburn, A. Shekhtman, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 91–93; b) S. Zuger, H. Iwai, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 736–740; c) M. Muona, A. S. Aranko, V. Raulinaitis, H. Iwai, *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 574–587; d) R. H. Kimura, E. R. Steenblock, J. A. Camarero, *Anal. Biochem.* **2007**, *369*, 60–70.
- [8] a) C. G. Miyada, L. Stoltzfus, G. Wilcox, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 4120–4124; b) L. M. Guzman, D. Belin, M. J. Carson, J. Beckwith, *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 4121–4130.
- [9] S. Wagner, M. M. Klepsch, S. Schlegel, A. Appel, R. Draheim, M. Tarry, M. Hogbom, K. J. van Wijk, D. J. Slotboom, J. O. Persson, J. W. de Gier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 14371–14376.
- [10] S. Tharun, W. He, A. E. Mayes, P. Lennertz, J. D. Beggs, R. Parker, *Nature* **2000**, *404*, 515–518.
- [11] a) T. Achsel, H. Brahms, B. Kastner, A. Bach, M. Wilm, R. Luhrmann, *Embo J.* **1999**, *18*, 5789–5802; b) J. Salgado-Garrido, E. Bragado-Nilsson, S. Kandels-Lewis, B. Seraphin, *Embo J.* **1999**, *18*, 3451–3462.
- [12] C. J. Wilusz, J. Wilusz, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 1031–1036.
- [13] a) M. Mund, A. Neu, J. Ullmann, U. Neu, R. Sprangers, *J. Mol. Biol.* **2011**, *414*, 165–176; b) B. Zaric, M. Chami, H. Remigy, A. Engel, K. Ballmer-Hofer, F. K. Winkler, C. Kambach, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 16066–16075.
- [14] A. E. Mayes, L. Verdone, P. Legrain, J. D. Beggs, *Embo J.* **1999**, *18*, 4321–4331.
- [15] A. K. Leung, K. Nagai, J. Li, *Nature* **2011**, *473*, 536–539.
- [16] I. Toro, S. Thore, C. Mayer, J. Basquin, B. Seraphin, D. Suck, *Embo J.* **2001**, *20*, 2293–2303.
- [17] M. A. Schumacher, R. F. Pearson, T. Moller, P. Valentin-Hansen, R. G. Brennan, *Embo J.* **2002**, *21*, 3546–3556.
- [18] C. Amero, M. Asuncion Dura, M. Noirellec-Savoye, A. Perollier, B. Gallet, M. J. Plevin, T. Vernet, B. Franzetti, J. Boisbouvier, *J. Biomol. NMR* **2011**, *50*, 229–236.
- [19] M. C. Stoffregen, M. M. Schwer, F. A. Renschler, S. Wiesner, *Structure* **2012**, *20*, 573–581.
- [20] N. K. Goto, K. H. Gardner, G. A. Mueller, R. C. Willis, L. E. Kay, *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 369–374.
- [21] I. Ayala, R. Sounier, N. Use, P. Gans, J. Boisbouvier, *J. Biomol. NMR* **2009**, *43*, 111–119.
- [22] C. Hesslinger, S. A. Fairhurst, G. Sawers, *Mol. Microbiol.* **1998**, *27*, 477–492.