

Die Entfaltung der C-terminalen α -Helix des Neuropeptids Y ist entscheidend für die Bindung und Aktivierung des Y_2 -Rezeptors**

Anette Kaiser, Paul Müller, Tristan Zellmann, Holger A. Scheidt, Lars Thomas, Mathias Bosse, Rene Meier, Jens Meiler, Daniel Huster, Annette G. Beck-Sickinger und Peter Schmidt*

Abstract: Trotz jüngster Fortschritte in der Strukturbestimmung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) gibt es nur wenige Daten zur Interaktion von GPCRs mit größeren Peptidliganden. In dieser Arbeit kombinieren wir Methoden der NMR-Spektroskopie, der molekularen Modellierung und der ortsgerichteten komplementären Mutagenese und präsentieren ein Strukturmodell des Peptidhormons Neuropeptid Y (NPY) im Komplex mit seinem humanen G-Protein-gekoppelten Y_2 -Rezeptor (Y_2R). Festkörper-NMR-Messungen von spezifisch isotoptenmarkiertem NPY im Komplex mit in vitro gefaltetem und in Phospholipid-Bizellen rekonstituiertem Y_2R liefern Daten zur bioaktiven Peptidstruktur. Unterstützt von Lösungs-NMR-Studien konnten Interaktionen des Liganden mit dem zweiten extrazellulären Loop des Rezeptors über hydrophobe Kontakte nachgewiesen werden. Die C-terminale α -Helix von NPY, die sich in einer Membrenumgebung in Abwesenheit des Rezeptors bildet, entfaltet sich ab T^{32} , um einen optimalen Kontakt tief in der Bindungstasche des transmembranen Bereichs des Y_2R zu ermöglichen.

Die Interaktion von GPCRs mit ihren natürlichen Liganden übernimmt eine zentrale Rolle in zahlreichen Signaltransduktionswegen in der Zelle. Für niedermolekulare Liganden einschließlich Peptiden wird aktuell ein konserviertes Bindungsmotiv für Klasse-A-GPCRs (Rhodopsin-ähnlich) diskutiert.^[1] Bis heute konnten Strukturmodelle der kleineren GPCR-gebundenen Peptidliganden Bradykinin,^[2] einer auf 6

Aminosäuren verkürzten Variante des Neurotensins,^[3] und der Fettsäure Leukotrien B_4 ^[4] mittels NMR-Spektroskopie erstellt werden.

Hier zeigen wir ein Struktur- und Bindungsmodell des 36 Aminosäuren großen, C-terminal amidierten Peptids NPY in rezeptorgebundener Form. Diese Interaktion spielt eine essentielle Rolle in der Regulation der Nahrungsaufnahme und der Gedächtnisfunktion und ist beteiligt an affektiven Störungen und Epilepsie.^[5] Die Rezeptorbindung von NPY wurde als ein zweistufiger Prozess postuliert.^[6] Diesem Modell zufolge bindet NPY zunächst an die Lipidmembran, um seine lokale effektive Konzentration zu erhöhen, und wird anschließend vom Y_2R erkannt.^[6]

Mittels Festkörper- und Lösungs-NMR-Spektroskopie erstellten wir einen Strukturdatensatz, der als Grundlage für die molekulare Modellierung und gerichtetes Docking genutzt wurde. Ergänzt wurde dieser Datensatz durch komplementäre Mutagenese-Studien, um die NPY/ Y_2R -Interaktionen zu verifizieren. Für die NMR-Messungen wurden mittels Festphasenpeptidsynthese zehn NPY-Varianten hergestellt, in denen insgesamt 30 der 36 Aminosäuren spezifisch ^{15}N / ^{13}C -markiert vorlagen (Hintergrundinformationen, Tabelle S1).

Die benötigten Milligramm-Mengen einer Cystein-freien Variante des Y_2R ^[7] konnten aus rekombinanter Expression in *E. coli* als Einschlusskörper und anschließender Reinigung in Natriumdodecylsulfat (SDS), wie vorher beschrieben,^[8] präpariert werden. Die Funktionalität des Rezeptors wurde in vitro in einem zweistufigen Faltungsprozess realisiert (siehe Hintergrundinformationen für Details). Zusammengefasst erfolgte zunächst mittels Dialyse eine Reduzierung der SDS-Konzentration unter die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC), während die Bildung der Disulfidbrücke zwischen den zwei verbliebenen Cysteinen durch Zugabe von Glutathion gewährleistet wurde. Im zweiten Schritt erfolgte durch wechselnde Temperaturzyklen^[9] eine funktionale Rekonstitution des Y_2R in 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DMPC)/1,2-Diheptanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DHPC-c7)-Bizellen in einem Y_2R /DMPC-Verhältnis von 1:200 oder 1:600. Die Größe der Bizellen wurde mittels Variation des molaren Verhältnisses von DMPC zu DHPC-c7 (q -Wert) auf isotrop bewegliche Bizellen ($q < 0.25$) oder auf große Membranstrukturen mit geringen residuellen Detergentien ($q > 20$) eingestellt,^[10] die für Lösungs- bzw. Festkörper-NMR genutzt wurden. Zuletzt wurde der rekonstituierte Y_2R für die NMR-Experimente konzentriert. Im Fall großer Membranstrukturen ($q > 20$) erfolgte dies durch Zentrifugation und für kleine Bizellen ($q < 0.25$) durch Dialyse gegen Polyethylenglykol 20000 zur Reduzierung des Wassergehalts der Probe. Die Funktionalität der

[*] P. Müller,^[†] Dr. H. A. Scheidt, Dr. L. Thomas, M. Bosse, Prof. Dr. D. Huster, Dr. P. Schmidt
Institut für Medizinische Physik und Biophysik
Universität Leipzig
Härtelstraße 16–18, 04107 Leipzig (Deutschland)
E-Mail: peter.schmidt@medizin.uni-leipzig.de
A. Kaiser,^[†] T. Zellmann,^[†] Dr. R. Meier, Prof. Dr. A. G. Beck-Sickinger
Institut für Biochemie, Universität Leipzig
Brüderstraße 34, 04103 Leipzig (Deutschland)
T. Zellmann,^[†] Prof. Dr. J. Meiler
Center for Structural Biology, Vanderbilt University
465 21stAve South, Nashville, TN 37203 (USA)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[**] Diese Studie wurde durch die Europäische Union, den Freistaat Sachsen (ESF 22117016 und 24127009) und die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 1052A3 und DFG BE1264/16) unterstützt. Arbeiten in der Meiler-Gruppe wurden von den NIH (R01 DK097376) und der NSF (CHE 1305874) unterstützt. Wir danken R. Reppich-Sacher und J. Schwesinger für technische Unterstützung und dem ZIH Dresden für die Bereitstellung von Rechenzeit.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201411688> zu finden.

Y_2R wurde in NPY-Bindungsstudien auf einen Anteil an funktionalen Rezeptormolekülen von $89 \pm 9\%$ verifiziert (Abbildung S1).

Festkörper-NMR- ^{13}C -DQSQ-Korrelationsspektren (dargestellt in den Abbildungen S2a und S3; DQSQ = double quantum–single quantum) wurden für alle NPY-Varianten im Y_2R -gebundenen Zustand bei $-30^\circ C$ aufgenommen, um den Einfluss der Dynamik des Rezeptors auf die Qualität der NMR-Spektren zu reduzieren.^[9] Die zugeordneten chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffsignale des Y_2R -gebundenen NPY (aufgelistet in Tabelle S2) und die resultierenden Indizes der chemischen Verschiebung^[11] (Abbildung 1a) wurden für die Modellierung von Peptidstrukturen

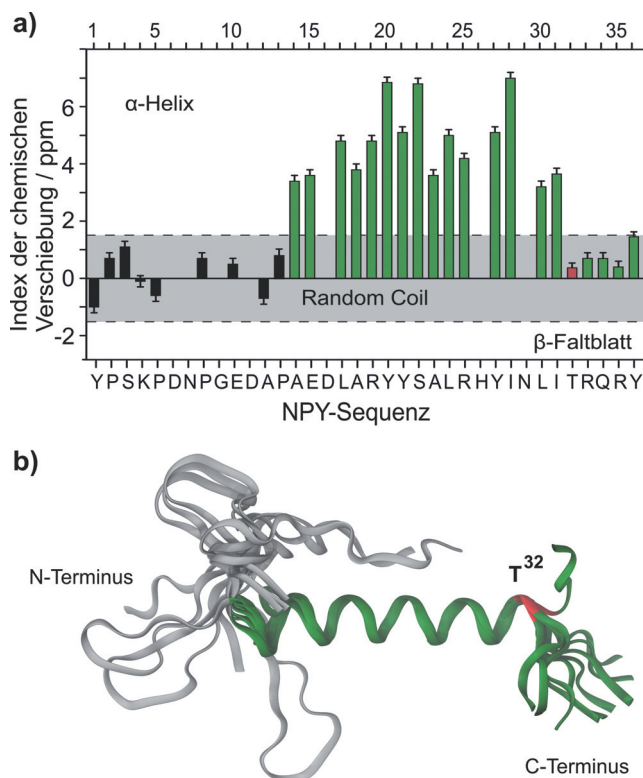


Abbildung 1. a) Index der ^{13}C -chemischen Verschiebung des Y_2R -gebundenen NPY (gemessene (C_α - C_β)-Random Coil (C_α - C_β)). b) Überlagerung der zehn bestbewerteten NPY-Modelle, abgeleitet aus den Festkörper-NMR-Strukturdaten. Der N-Terminus (grau) wurde nicht für die Bewertung herangezogen. Die C-terminale α -Helix-Struktur von NPY (grün) entfaltet sich ab T^{32} (rot) bei Rezeptorbindung.

genutzt, indem von 400000 de novo gefalteten NPY-Strukturen die vorhergesagten chemischen Verschiebungen^[12] mit den experimentellen Daten verglichen wurden. Überraschenderweise zeigten die zehn bestbewerteten Modelle (dargestellt in Abbildung 1b) eine C-terminale ungefaltete Struktur von T^{32} bis Y^{36} . Dies unterscheidet sich deutlich von den NPY-Strukturen in Lösung^[13] und an Mizellen,^[14] in denen die α -Helix bis zum amidierten C-Terminus ausgebildet ist. Es ist jedoch möglich, dass NPY bei sehr niedrigen, physiologischen Konzentrationen in Lösung als Monomer vorliegt und in diesem Zustand der C-Terminus nicht vollständig gefaltet ist.^[13]

Zur Identifizierung der positionsspezifischen Änderungen im NPY infolge der Y_2R -Bindung wurden zweidimensionale $^1H/^{15}N$ -HSQC-NMR-Spektren für alle NPY-Varianten sowohl in Anwesenheit von Y_2R -beladenen Bizellen als auch von leeren Bizellen aufgenommen (Abbildung S2b). Die gewichteten Änderungen der chemischen Verschiebungen und die Signalverbreiterungen, die durch lokale Austauschprozesse (z. B. Austausch in der Bindungstasche) oder durch reduzierte globale Bewegung des Komplexes verursacht werden, sind in Abbildung 2a dargestellt. Die Schwel-

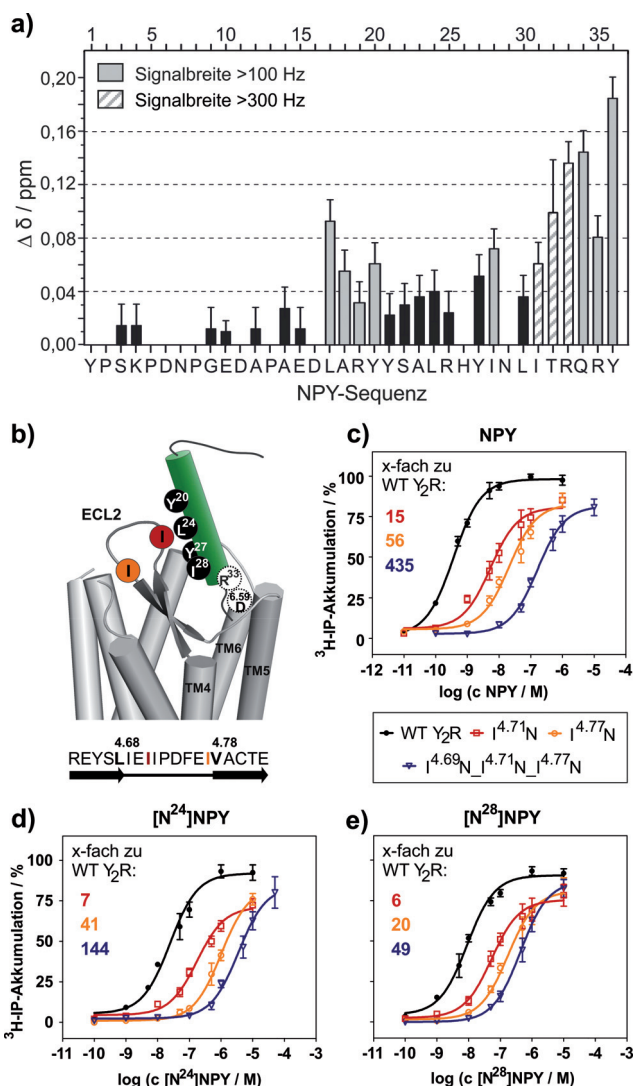


Abbildung 2. a) Aus HSQC-Lösungs-NMR-Spektren gemessene Änderungen der gewichteten chemische Verschiebung ($\Delta\delta = [(\Delta\delta^1H)^2 + (0.2\Delta\delta^{15}N)^2]^{1/2}$) und 1H -NMR-Signalverbreiterung von > 100 Hz (grau) und > 300 Hz (schraffiert) zwischen membran- und Y_2R -gebundenem NPY. b) Schema des initialen Komplex-Modells von NPY (grün) in einer hydrophoben Tasche des Y_2R . c–e) Komplementäre Mutagenese zur Identifizierung der interagierenden Reste zwischen ECL2 und NPY. Die Y_2R -Mutanten $I^{4.71}N$ (rot), $I^{4.77}N$ (orange) und die kombinierte Variante $I^{4.69}N-I^{4.71}N-I^{4.77}N$ (blau) wurden gegen $[N^{24/28}]NPY$ getestet. Werte in der linken oberen Ecke zeigen die relativen Verschiebungen der EC_{50} -Werte zum Wildtyp- Y_2R . Reduzierte EC_{50} -Verschiebungen kennzeichnen eine direkte Interaktion zwischen Rezeptor und Peptid an der modifizierten Position.

lenwerte für die Linienverbreiterung von >100 Hz und >300 Hz sind willkürlich gewählt und dienen der Illustration dieser Effekte (exakte Linienbreiten sind in Tabelle S2 aufgelistet). Signifikante Änderungen konnten nicht nur für die sechs C-terminalen Reste, welche bereits als kritisch für Y_2R -Bindung bekannt sind,^[15] beobachtet werden. Auch die gemessenen Änderungen der chemischen Verschiebung und/oder der Linienbreiten im hydrophoben Teil der α -Helix im NPY (L^{17}/A^{18} , Y^{20}/Y^{21} , L^{24} , Y^{27}/I^{28} , I^{31}) deuten auf ein weiteres Bindungsmotiv hin, welches über hydrophobe Kontakte vermittelt ist.

Auf Grundlage eines Y_2R -Homologiemodells identifizierten wir hydrophobe Reste im zweiten extrazellulären Loop (ECL2) als mögliche Interaktionspartner und tauschten diese gegen Asparagin (vergleichbare Größe, hydrophil) aus. Die Reste $I^{4.71}$ und $I^{4.77}$ im Rezeptor (Y_2R -Nomenklatur entsprechend)^[16] reagierten auf die Mutation, und mittels komplementärer Mutagenese mit modifizierten Liganden konnten direkte Kontakte zu L^{24} und I^{28} nachgewiesen werden (Details siehe Hintergrundinformationen und Tabelle S3).

Die neu identifizierten Interaktionen und die bereits bekannte Salzbrücke zwischen R^{33} (NPY) und $D^{6.59}$ ^[17] am extrazellulären Ende der sechsten Transmembranhelix (TM6) des Y_2R wurden im Folgenden als experimentelle Randbedingung für die Docking-Studien genutzt. Dabei wurde der C-terminale Teil (NPY^{13–36}) der bioaktiven Ligandenkonformationen (Abbildung 1) mittels ROSETTA in ein Homologiemodell des Y_2R gedockt (Details in den Hintergrundinformationen). Das NPY/ Y_2R -Modell mit der besten Übereinstimmung zu den experimentellen Daten und den bekannten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen des NPY ist in Abbildung 3 dargestellt. Eine semiquantitative energetische Analyse des Komplexes unterstreicht die zunehmende Beteiligung der C-terminalen Aminosäuren an der Wechselwirkung (Abbildung 4a) und zeigt auch eine qualitativ gute

Übereinstimmung mit durch Mutagenese identifizierten Interaktionspositionen im Rezeptor^[15,17] (Abbildung 4b).

Die hydrophoben Kontakte zum ECL2 positionieren den Liganden in einem Winkel von etwa 45° relativ zur Membran-Normalen. Aufgrund der hohen Dynamik des Rezeptors^[9] ist die Position von NPY in der Bindungstasche jedoch vermutlich nicht statisch. Es ist vielmehr anzunehmen, dass der Ligand der Bewegung des ECL2 folgt (dieser Bereich wurde während des Dockings neu modelliert, um der hohen Flexibilität Rechnung zu tragen) und der gebundene C-Terminus als Anker im Rezeptor dient. Daraus ergibt sich eine konische Verteilung der Ligandenpositionen mit zunehmender Amplitude zum N-Terminus (Abbildung 3a). Möglicherweise erfolgt über den hydrophoben Kontakt zur extrazellulären Domäne des Rezeptors eine initiale Bindung des Liganden aus dem membrangebundenen Zustand oder direkt aus der Lösung, und es findet eine Vororientierung von NPY in die Bindungstasche statt. Infolge der Relokalisierung der α -Helix des NPY aus der Membrenumgebung werden für die Membranbindung wichtige Aminosäuren des Liganden ($L^{17}/Y^{20}/Y^{21}$)^[15] in eine eher polare Umgebung gebracht. Dies wird durch die Ergebnisse der Lösungs-NMR-Studien unterstützt (Abbildung 2a).

Gleichzeitig gehen die Membrankontakte von L^{24} , I^{28} und des entfalteten C-terminalen Pentapeptids^[6] in thermodynamisch günstigere, direkte Rezeptorinteraktionen über (Abbildung 4). Auf diese Weise werden, wie bereits vorgeschlagen,^[15] die Rezeptorkontakte in der tiefgehenden Bindungstasche maximiert (Abbildung 3b). Da PYY, der zweite endogene hochaffine Ligand des Y_2R , eine identische Sequenz für die C-terminalen fünf Aminosäuren aufweist und bereits im lipidgebundenen Zustand eine C-terminale gestreckte Struktur besitzt,^[18] ist die thermodynamische Barriere für solch einen Übergang vermutlich niedrig.

Die Übergangsposition zum C-terminal gestreckten Bereich um T^{32} liegt an einer Engstelle über der Bindungstasche

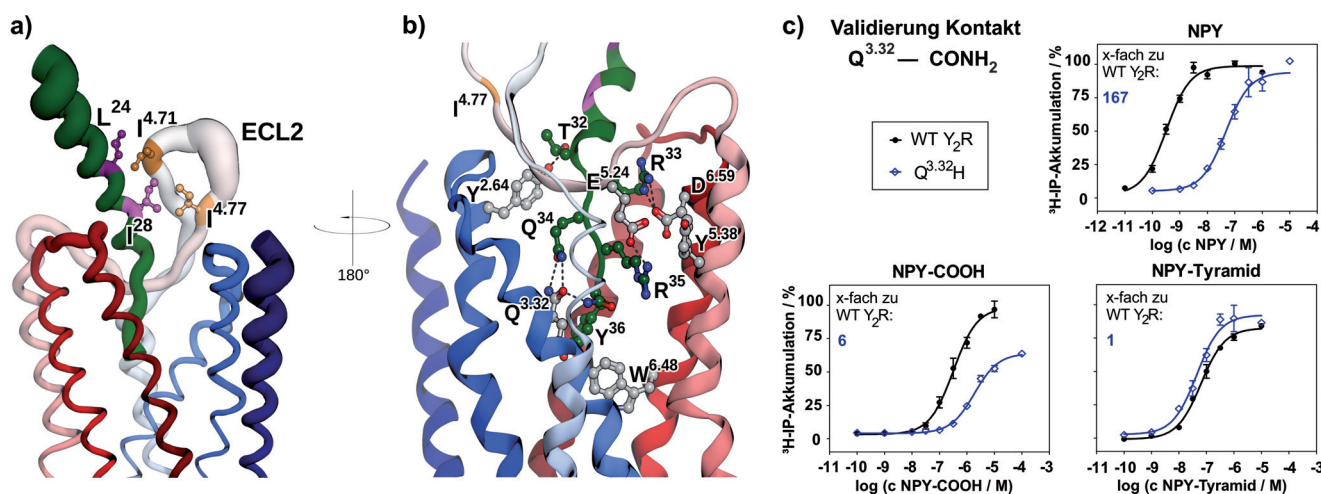


Abbildung 3. Modell des Komplexes aus NPY (grün) und dem Y_2R (blau-roter Farbverlauf von N- zum C-Terminus). Die strukturelle Diversität des Ensembles ist durch die Dicke des Rückgrats angedeutet. NPY bindet an den ECL2 durch Interaktionen von L^{24} (violett) und I^{28} (pink) an $I^{4.71}$ bzw. $I^{4.77}$ (orange). b) Repräsentatives Modell des C-Terminus von NPY. Polare Wechselwirkungen sind durch gestrichelte Linien dargestellt. c) Die Interaktion von $Q^{3.32}$ (hellblau) zur C-terminalen Amidgruppe von NPY wurde durch komplementäre Mutagenese verifiziert. Dafür wurde ein (leicht) basischer Interaktionspartner für die freie Säure des NPY generiert bzw. mit einem Analogon ohne C-terminale Funktionalität stimuliert (NPY-Tyramid), das nicht sensitiv auf Austausch im Rezeptor an der entsprechenden Position reagiert.

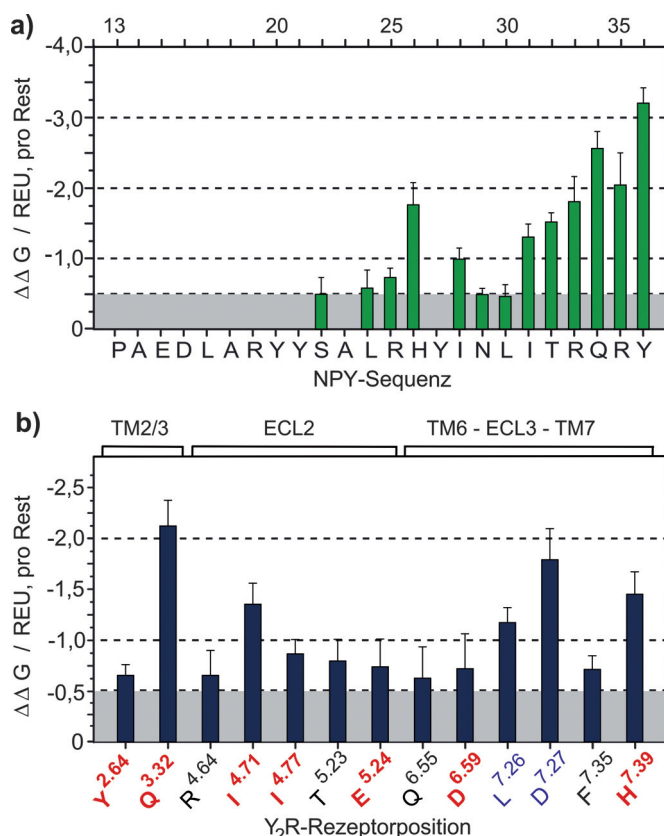


Abbildung 4. Energetische Analyse des NPY^{13-36} - Y_2R -Komplexes. a) Der Bindungsbeitrag nimmt in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Lösungs-NMR-Studien (Abbildung 2a) zum C-Terminus des Liganden zu. b) Auf Rezeptorseite tragen insgesamt 13 Positionen signifikant zur Ligandenbindung bei, die meisten (rot) sind bereits bekannte^[15,17] oder hier neu identifizierte Interaktionsstellen. L^{7.26} und D^{7.27} (blau) sind falsch-positive Reste, die in vielen energetisch günstigen Modellen eine ionische Wechselwirkung mit R²⁵/H²⁶ im Liganden zeigen, reagieren jedoch nicht sensitiv auf Rezeptormutagenese. Nur Bindungsbeiträge von > 0.5 ROSETTA-Energieeinheiten (REU) wurden als signifikant angesehen (grauer Hintergrund).

und könnte für den Bindungsprozess zwei wesentliche Funktionen erfüllen: 1) T³² fungiert als Wasserstoffbrückenakzeptor für Y^{2.64}. Infolgedessen wird die Bindungstasche geschlossen und NPY in seiner finalen Bindungsposition arretiert. Entsprechend wurde eine Verbreiterung der Signale (> 300 Hz) von T³² und der benachbarten Reste beobachtet (Abbildung 2a). 2) Zusätzlich wird der thermodynamische Betrag für die Entfaltung der α -Helix in dieser eher apolaren Umgebung gesenkt, indem T³² als Wasserstoffbrückendonator zum exponierten Carbonylsauerstoff des N²⁹ fungiert. In ähnlicher Weise wird beispielsweise auch die Entfaltung der C-terminalen Helix des $G\alpha_{i/o}$ -Proteins infolge der Rezeptorbindung kompensiert, in diesem Fall durch ein Cystein (C³⁵¹ im humanen $G\alpha_{i1}$).^[19]

Die zentrale Bedeutung von R³³ und R³⁵ für die Aktivität von NPY^[5] wird aus unserem Modell sehr deutlich. Während R³³ auf engem Raum eine ionische Interaktion mit D^{6.59} aufweist, liegt R³⁵ in einer gemischt sauer-aromatischen Tasche, die von W^{5.26} und Y^{5.38} gebildet und durch E^{5.24} koordiniert wird. Dies korrespondiert mit früheren Studien, in denen

aromatische Eigenschaften an Position 35 für die Peptidaktivität erforderlich waren,^[20] und erklärt zudem die Schwierigkeiten, einen direkten Interaktionspartner für R³⁵ in dieser komplexen Bindungstasche zu identifizieren.^[15]

Eine besonders wichtige Position für die Aktivität von NPY am Y₂R ist Q³⁴.^[5] Durch die relativ tiefe Bindung des Peptids im Transmembranbereich des Rezeptors ist dieser Rest in seiner Orientierung eingeschränkt und wird in einer kleinen polaren Tasche an TM2/3 arretiert. Unser Modell zeigt eine Interaktion des Q³⁴ mit Q^{3.32}. Diese Rezeptorposition ist Teil eines komplexen Wasserstoffbrückennetzwerks, in dem auch der amidierte C-Terminus (CONH₂) des Peptids gebunden ist. Um diese Interaktion zu validieren, wurde durch Mutagenese ein (leicht) basischer Interaktionspartner für die ansonsten wenig affine freie Säure des NPY (NPY-COOH) genutzt. Wie in Abbildung 3c gezeigt, konnte durch Stimulation mit NPY-COOH der Aktivitätsverlust der Q^{3.32}H-Rezeptorvariante gegenüber dem WT-Rezeptor deutlich reduziert werden. In ähnlicher Weise trat auch ein relativer Aktivitätsgewinn der Q^{3.32}H-Variante auf, wenn die Rezeptoren mit NPY-Tyramid^[21] stimuliert wurden. Dieses Analogon besitzt keine C-terminale CONH₂- (oder COOH)-Funktionalität und ist folglich nicht sensitiv gegenüber Austauschen des jeweiligen Interaktionspartners im Rezeptor (Details in den Hintergrundinformationen).

Das Interaktionsnetzwerk um Q³⁴, Q^{3.32} und die C-terminale Amidierung bedingen die Positionierung der Seitenkette des Y³⁶. Dieser Rest liegt in einer hydrophoben Umgebung (C^{2.47}, W^{6.48}, L^{6.51}, M^{7.43}) und füllt eine lange, schmale Tasche im Rezeptor. Besonders interessant ist auch die Nähe der Y³⁶-Seitenkette zu W^{6.48}, einer Rezeptorposition, die als Schalter der GPCR-Aktivierung diskutiert wird.^[22] Weitere Studien gehen von einer direkten Interaktion zwischen W^{6.48} und dem Ligand aus,^[23] sodass Wechselwirkungen mit dieser Rezeptorposition möglicherweise ein allgemeingültiger Mechanismus der GPCR-Aktivierung darstellen könnte.

Zusammenfassend konnten wir, basierend auf einem umfangreichen und komplementären Datensatz, ein detailliertes Strukturmodell des NPY in gebundener Form am Y₂-GPCR generieren. NMR-Untersuchungen zeigten deutliche strukturelle Veränderungen für die C-terminalen Aminosäuren des NPY, die mit dem Rezeptor über ein ausgedehntes, aber auch fragiles Netzwerk interagieren. Dementsprechend können Veränderungen in diesen Regionen leicht zu Beeinträchtigungen in der Rezeptorbindung führen oder die Rezeptorselektivität verändern.^[5] Darüber hinaus gibt unsere Studie Hinweise darauf, dass auch größere Peptidliganden die postulierte gemeinsame transmembrane Bindungstasche Rhodopsin-ähnlicher GPCRs^[11] nutzen, obwohl keine so tiefe Bindung im Transmembranbereich erwartet werden konnte. Insofern ist der Bindungsmodus des NPY am Y₂R auch von Bedeutung für andere Peptid-bindende GPCRs.

Stichwörter: GPCR-Mutagenese · Neuropeptid Y · NMR-Spektroskopie · Peptidstrukturen · Rezeptoren

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 7446–7449
Angew. Chem. **2015**, *127*, 7554–7558

-
- [1] A. J. Venkatakrishnan, X. Deupi, G. Lebon, C. G. Tate, G. F. Schertler, M. M. Babu, *Nature* **2013**, *494*, 185–194.
- [2] J. J. Lopez, A. K. Shukla, C. Reinhart, H. Schwalbe, H. Michel, C. Glaubitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1668–1671; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1692–1695.
- [3] S. Luca, J. F. White, A. K. Sohal, D. V. Filippov, J. H. van Boom, R. Grishammer, M. Baldus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 10706–10711.
- [4] L. J. Catoire, M. Damian, F. Giusti, A. Martin, H. C. van, J. L. Popot, E. Guittet, J. L. Baneres, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9049–9057.
- [5] X. Pedragosa-Badia, J. Stichel, A. G. Beck-Sickinger, *Front. Endocrinol.* **2013**, *4*, 5.
- [6] R. Bader, O. Zerbe, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1520–1534.
- [7] K. Witte, A. Kaiser, P. Schmidt, V. Splith, L. Thomas, S. Berndt, D. Huster, A. G. Beck-Sickinger, *Biol. Chem.* **2013**, *394*, 1045–1056.
- [8] P. Schmidt, C. Berger, H. A. Scheidt, S. Berndt, A. Bunge, A. G. Beck-Sickinger, D. Huster, *Biophys. Chem.* **2010**, *150*, 29–36.
- [9] P. Schmidt, L. Thomas, P. Müller, H. A. Scheidt, D. Huster, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 4986–4992.
- [10] W. S. Son, S. H. Park, H. J. Nothnagel, G. J. Lu, Y. Wang, H. Zhang, G. A. Cook, S. C. Howell, S. J. Opella, *J. Magn. Reson.* **2012**, *214*, 111–118.
- [11] S. Spera, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5490–5492.
- [12] D. E. Kim, D. Chivian, D. Baker, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W526–W531.
- [13] S. A. Monks, G. Karagianis, G. J. Howlett, R. S. Norton, *J. Biomol. NMR* **1996**, *8*, 379–390.
- [14] R. Bader, A. Bettio, A. G. Beck-Sickinger, O. Zerbe, *J. Mol. Biol.* **2001**, *305*, 307–329.
- [15] B. Xu, H. Fallmar, L. Boukharta, J. Pruner, I. Lundell, N. Mohell, H. Gutierrez-de-Teran, J. Aqvist, D. Larhammar, *Biochemistry* **2013**, *52*, 7987–7998.
- [16] J. A. Ballesteros, H. Weinstein, *Methods in Neurosciences*, Vol. 25, Academic Press, New York, **1995**, 366–428.
- [17] N. Merten, D. Lindner, N. Rabe, H. Römler, K. Mörl, T. Schöneberg, A. G. Beck-Sickinger, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 7543–7551.
- [18] M. Lerch, M. Mayrhofer, O. Zerbe, *J. Mol. Biol.* **2004**, *339*, 1153–1168.
- [19] N. S. Alexander, A. M. Preininger, A. I. Kaya, R. A. Stein, H. E. Hamm, J. Meiler, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2014**, *21*, 56–63.
- [20] L. Albertsen, S. Ostergaard, J. F. Paulsson, J. C. Norrild, K. Stromgaard, *ChemMedChem* **2013**, *8*, 1505–1513, 1422.
- [21] S. Hoffmann, B. Rist, G. Videnov, G. Jung, A. G. Beck-Sickinger, *Regul. Pept.* **1996**, *65*, 61–70.
- [22] J. H. Park, P. Scheerer, K. P. Hofmann, H. W. Choe, O. P. Ernst, *Nature* **2008**, *454*, 183–187.
- [23] L. A. Stoddart, B. Kellam, S. J. Briddon, S. J. Hill, *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 3827–3844.
-
- Eingegangen am 4. Dezember 2014,
veränderte Fassung am 24. Februar 2015
Online veröffentlicht am 29. April 2015