

Verbesserung der Dispersion der chemischen Verschiebungen von unstrukturierten Proteinen durch einen kovalent gebundenen Lanthanoidkomplex

Christoph Göbl, Moritz Resch, Madeleine Strickland, Christoph Hartlmüller, Martin Viertler, Nico Tjandra* und Tobias Madl*

Abstract: Die Erforschung von intrinsisch unstrukturierten Proteinen (IDPs) mit NMR-spektroskopischen Methoden wird oftmals durch starke Überlagerung der Proteinsignale erschwert. Dies führt zu uneindeutigen Zuordnungen dieser Signale und erschwert die Datenanalyse, in welcher oftmals eine gute Separierung der Signale die Grundlage der Dateninterpretation bildet. In dieser Arbeit berichten wir von der Möglichkeit, einen Lanthanoidkomplex kovalent an das Zielprotein zu binden, der zu einer erhöhten Dispersion der Signale führt. Wir zeigen diesen Effekt an Proteinen mit sich wiederholenden Aminosäuresequenzen, welche somit besonders von Signalüberlappung betroffen sind. Die Bindung eines DOTA-basierten Lanthanoidkomplexes an ein Cystein führt zu pseudochemischen Verschiebungen (PCS), die noch in mehr als 20 Aminosäureresten entfernten Regionen detektierbar sind. Die stark erhöhte Dispersion der beobachteten Signale führt zu einer beträchtlichen Erleichterung in der Zuordnung und Datenauswertung.

Das lange geltende Konzept des Struktur-Funktions-Prinzips von Proteinen wurde durch die Erforschung von IDPs stark hinterfragt, denn trotz des Fehlens einer stabilen 3-dimensionalen Struktur spielt die Gruppe der unstrukturierten Proteine eine wesentliche Rolle in wichtigen zellulären Pro-

zessen.^[1,2] Es wurde errechnet, dass bis zu 40 % aller eukaryotischen Proteine solche Bereiche mit mehr als 40 unstrukturierten Aminosäuren aufweisen.^[3] Für die Charakterisierung dieser Bereiche stellt die Methode der NMR-Spektroskopie eine exzellente Möglichkeit dar, dies in Lösung und unter zellähnlichen Bedingungen durchzuführen.^[4] Beispielsweise können Proteindynamiken, Wechselwirkungen oder niedrige Populationen von Reststrukturen ermittelt werden. Dies erfordert die eindeutige Zuordnung der jeweiligen Atome zu deren NMR-Signalen. Diese Zuordnung wird bei unstrukturierten Proteinen jedoch dadurch erschwert, dass die Beiträge von hydrophoben Gruppen oder Aromaten fehlen, die zu einer starken Dispersion der Signale in strukturierten Proteinen führen.^[5] Aus diesem Grund wurden bereits verschiedene Methoden vorgestellt, beispielsweise die Erstellung kürzerer Proteinsequenzen, deren somit vereinfachte Zuordnung und die Übertragung dieser Information auf das Vollängenkonstrukt.^[6] Die vorteilhaften Eigenschaften von IDPs wie etwa deren langsame Relaxation erlauben auch die Aufnahme von hochdimensionalen Spektren (bis zu 7 Dimensionen), was deren eindeutige Zuordnung erleichtert.^[7] Weiters wurde auch die verbesserte Auflösung von Spektren gezeigt, die durch die direkte Detektion von Heteroatomen wie ¹³C oder ¹⁵N aufgenommen wurden.^[8,9] Die erwähnten Methoden können jederzeit durch die Aufnahme von ungleich verteilten Datenpunkten (NUS) oder die Anwendung nicht Fourier-basierter Prozessierungsalgorithmen oder Schnellpulssequenzen erweitert werden, um schnellere Messungen mit höherer Auflösung durchzuführen.^[10]

Trotz dieser bemerkenswerten Verbesserungen besteht jedoch oftmals das Problem der Signalüberlagerung, was besonders bei der Detektion von molekularen Wechselwirkungen, der Messung von Proteindynamiken oder der zugrundeliegenden Signalzuordnung zu Problemen führen kann. Davon sind besonders unstrukturierte Proteine betroffen, die eine niedrige Sequenzheterogenität aufweisen, wie sie vor allem in sogenannten Niedrigkomplexregionen vorkommen.^[11]

Hier berichten wir von einer Möglichkeit zur Verbesserung der Dispersion chemischer Verschiebungen. Dabei wird durch die kovalente Bindung eines Lanthanoidkomplexes eine pseudochemische Verschiebung induziert, was zu Veränderungen der Resonanzen in bis zu 26 Aminosäuren entfernten Regionen führt. Bisher wurde von einer großen Anzahl an paramagnetischen Komplexen berichtet, deren Effekte auf Proteine beschrieben wurden.^[12] Dabei haben sich besonders

[*] Dr. C. Göbl, M. Resch, C. Hartlmüller, Prof. Dr. T. Madl

Center for Integrated Protein Science Munich

Technische Universität München, Fakultät für Chemie
Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching (Deutschland)

Dr. C. Göbl, M. Resch, C. Hartlmüller, M. Viertler, Prof. Dr. T. Madl
Institut für Strukturbioologie, Helmholtz Zentrum München
Ingolstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg (Deutschland)

Prof. Dr. T. Madl

Institut für Molekularbiologie & Biochemie, Zentrum für Medizinische Forschung, Medizinische Universität Graz
8010 Graz (Österreich)

E-Mail: tobias.madl@medunigraz.at

Dr. M. Strickland, Dr. N. Tjandra

Laboratory of Structural Biophysics Biochemistry and Biophysics
Center, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health
Building 50, Bethesda, MD 20814 (USA)

E-Mail: tjandran@nhlbi.nih.gov

 Hintergrundinformationen (Proteinaufreinigung, Komplexbindung,

 Datenaufnahme, diamagnetische Lu-M8-Proben und Relaxationsraten für FUS und Lef-1) und Identifikationsnummern (ORCIDs) der Autoren sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201607261> zu finden.

die Lanthanoide als sehr nützlich erwiesen, denn durch deren variierende Eigenschaften des Suszeptibilitätstensors kann man den gewünschten Effekt recht gut dadurch einstellen, dass man das jeweilig bevorzugte Atom durch sehr ähnliche Bindungseigenschaften in den Komplex einführt.^[13] Als Grundgerüst dienen beispielsweise cyclische Polyamine, die sich durch eine starke Affinität und gute Rigidität auszeichnen, nichtsdestotrotz werden oftmals mehrere isomere Formen beobachtet, die zu einer Aufteilung in mehrere chemische Verschiebungen der beeinflussten Atome führen. Dieser unerwünschte Effekt konnte durch verschiedene Modifikationen entscheidend verringert werden.^[14] In unserem Fall war der DOTA-M8-Ytterbiumkomplex (Yb-M8; DOTA = 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure)^[15] zielführend, um eine Erhöhung der Signaldispersion zu erreichen. Dieser kann bei der Komplexbildung mit verschiedenen Lanthanoiden durchaus zu einer Verdoppelung der Signale führen, bei der Verwendung von Ytterbium erreicht man aber eine fast vollständige Population von nur einem Isomer.^[16] Außerdem führt Ytterbium nur zu einer moderaten paramagnetischen Relaxationsratenerhöhung (PRE) bei gleichzeitig guten Eigenschaften zur Induktion von pseudochemischen Verschiebungen.

Yb-M8 wurde nun an ein IDP gebunden, welches eine häufige Wiederholungssequenz von Arginin–Glycin–Glycin (RGG) aufweist, der C-terminalen Domäne des Proteins FUS (fused in sarcoma, Region 454–526). Dieses Protein bindet sowohl an DNA als auch RNA und ist an verschiedenen Krankheiten wie ALS (Amyotrophe Lateralsklerose) oder FTLD (Frontotemporallappen-Degeneration) beteiligt.^[17] Es enthält zwei strukturierte, nukleotidbindende Domänen und mehrere unstrukturierte Bereiche. Der ebenfalls unstrukturierte C-Terminus von FUS wird häufig an dessen Arginin-Seitenketten methyliert und ist wesentlich an der Bildung von *stress granules* und am Zellimport beteiligt und bindet beispielsweise am Kernimportfaktor Transportin-1 und an verschiedene G-Quadruplex-RNAs.^[17–19] Die erwähnte RGG-Region ist 36 Aminosäuren lang (472–505), beinhaltet 18 Glycine und 10 Arginine (Abbildung S1a in den Hintergrundinformationen) und ist intrinsisch unstrukturiert. Die chemischen Verschiebungen dieser Region sind sowohl in der ¹H-, als auch in der ¹⁵N- und ¹³C-Region stark überlagert und unter Zuhilfenahme von einigen eingangs erwähnten Methoden konnten nur 16 der 36 Aminosäuren zugeordnet werden. In dieses Konstrukt wurden nun N- und C-terminal dieser Region mittels Einzelmutation Cysteinreste (D470C und D502C) eingefügt, um unter Zuhilfenahme des Lanthanoidkomplexes eine Verbesserung der Dispersion der chemischen Verschiebung zu erreichen. Interessanterweise war die Bindung des Komplexes zu diesem dynamischen Konstrukt noch starr genug, um genau den gewünschten Effekt zu erzielen. In Abbildung 1a wird der Effekt des Komplexes an einem ¹H¹⁵N-HSQC-Spektrum gezeigt. Dabei werden die stärksten Effekte (bis zu 2 ppm Verschiebung) in der unmittelbaren Nähe des Lanthanoids beobachtet, und selbst 26 Reste entfernt, bei Glycin 496, verschiebt sich dessen Signal noch um eine halbe Linienbreite (0.029 ppm in der Protomedimension bei der Bindung des Komplexes an Cystein 470).

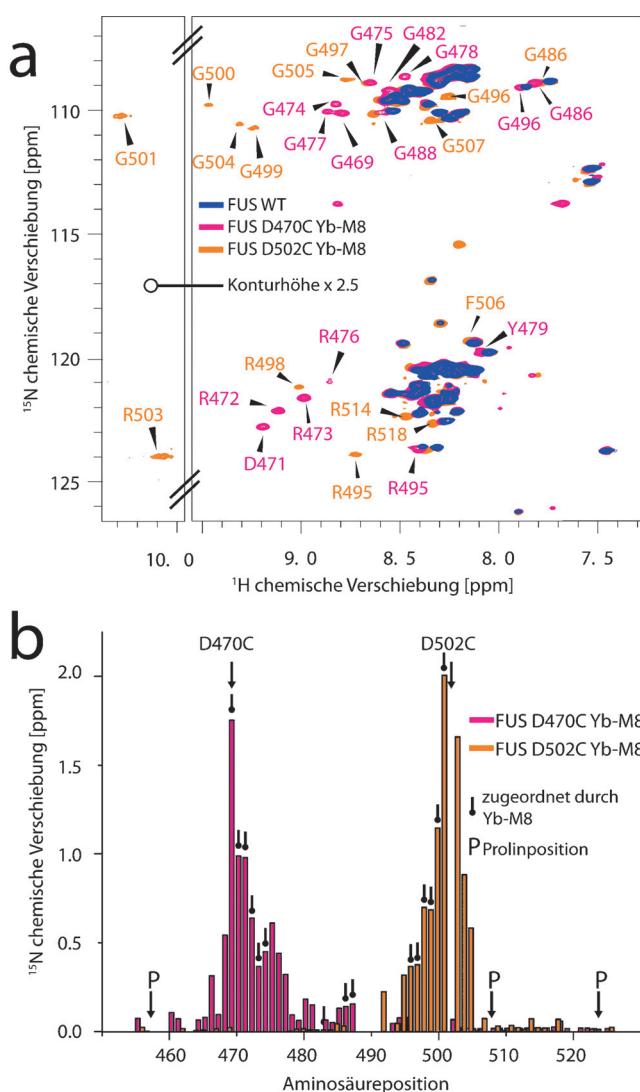


Abbildung 1. Spektrale Änderungen durch Einführung des Yb-M8-Komplexes in FUS (454–526). a) Überlagerung der ¹H¹⁵N-HSQC-Spektren der Referenzprobe (blau) und der jeweils mit Yb-M8 gebundenen Probe (D470C in magenta und D502C in orange). Die Proteinkonzentrationen betragen jeweils 200 μM und die Daten wurden auf einem 900-MHz-Spektrometer mit denselben Einstellungen aufgenommen (8 kumulative Scans, 128 komplexe Datenpunkte, 1 s Magnetisierungsaufbaudauer). b) Änderung der ¹H-chemischen Verschiebung nach Bindung des Komplexes. Signale, die nur durch die Einführung des Yb-M8-Komplexes zugeordnet werden konnten, sind markiert; Prolinreste sind mit P gekennzeichnet. Die Referenzwerte für nicht zuordnbare Aminosäuren im Wildtyp wurden mithilfe eines Online-Vorhersageprogramms mit Sequenz-, Temperatur- und pH-Korrektur bestimmt.^[21]

Man kann im Histogramm in Abbildung 1b erkennen, dass die PCS-Effekte für das Yb-M8-gebundene Cystein 470 in Richtung N-Terminus stärker abnehmen, und im Gegensatz bei Anbringung der Lanthanoidgruppe an Cystein 502 eine stärkere C-terminale Ausmittelung der Effekte sichtbar wird. Dieser Effekt basiert höchstwahrscheinlich auf der verstärkten Ausmittelung der paramagnetischen Effekte durch erhöhte terminale Dynamiken. Zur Kontrolle der beobachteten Effekte wurde derselbe Komplex an Cystein 470 angebracht, jedoch mit gebundenem diamagnetischem Lute-

tum (Abbildung S2). Dieser diamagnetische Komplex führt wie erwartet nur zu sehr kleinen Verschiebungssänderungen in unmittelbarer örtlicher Nähe und bestätigt somit die Schlussfolgerung, dass die Verschiebung durch den paramagnetischen PCS-Effekt von Ytterbium ausgeht.

Die resultierende hohe Dispersion der chemischen Verschiebung durch den Yttriumkomplex ermöglicht nun eine rasche Zuordnung durch die Aufnahme der Standardexperimente HNCACB und CBCA(CO)NH (Abbildung S1b).^[20] Durch den geringen PRE-Effekt war es durchaus möglich, die Ca/Cβ-Atome der jeweiligen Cysteine zu beobachten (Abbildung S1b). In Abbildung S3 wird gezeigt, dass weiter entfernte Aminosäurenrückgratsignale oder aromatische Seitenketten nicht durch den Komplex beeinflusst werden und somit keine künstlichen Wechselwirkungen hervorgerufen worden sind. Um diesen Effekt des Komplexes an weiter entfernten Resten besser auszuschließen zu können, wurden neben {¹H}-{¹⁵N}-Hetero-NOE-Experimenten noch longitudinale und transversale Relaxationsraten an ¹H und ¹⁵N aufgenommen (Abbildung S4). Die Daten zeigen, dass die gemessenen Werte von sequentiell entfernten Aminosäuren durchaus mit der unkomplexierten Referenz übereinstimmen und somit von keiner Beeinflussung durch den Komplex ausgegangen werden kann.

Ein weiterer Test der beschriebenen Methode wurde am Protein Lef-1 (lymphoid enhancer-binding factor 1) durchgeführt. Hier wurde der Komplex an das einzige nativ verfügbare Cystein der unstrukturierten N-terminalen Domäne (Region 1–101, Cystein an Position 18) gebunden. Das Protein Lef-1 ist ein Transkriptionsfaktor und spielt eine wesentliche Rolle im WNT-Signalweg. In der N-terminalen Region des angebrachten Komplexes befindet sich eine Niedrigkomplexregion mit acht aufeinanderfolgenden Glycinresten, von welchen die meisten Signale stark überlagert sind und die eine stark überlagerte Region im Spektrum bilden. Nach Anbringung des Komplexes verschwindet diese Überlagerung jedoch vollständig und die einzelnen Glycinreste erscheinen einzeln in einem separierten Bereich des Spektrums (Abbildung 2a). Das Histogramm in Abbildung 2b zeigt die einzelnen ¹H-Verschiebungsunterschiede, die größte Änderung wurde wie erwartet am komplexierten Cystein beobachtet (1.2 ppm). Zwei umgebende Prolinreste (an Position i–3 und i + 7) führen höchstwahrscheinlich durch *cis-trans*-Racemisierung zu einer geringfügigen Verringerung von PCS-Effekten. Im Gegensatz zum Protein FUS werden bei Lef-1 durchaus auch negative pseudochemische Verschiebungen beobachtet. Eine Kontrollreaktion mit diamagnetischem Lutetiumkomplex zeigt wiederum eine sehr geringe Beeinflussung der chemischen Verschiebungen (Abbildung S5). Auch die Aufnahme von Relaxationsraten der Rückgratstickstoffe der mit Ytterbiumkomplex gebundenen Probe zeigt abermals keine weitreichenden Effekte (Abbildung S6). Für Lef-1 können durch die bessere Auflösung in den Referenzspektren die Verhältnisse der einzelnen Signalintensitäten gut dargestellt werden (Abbildung S7). Es zeigt sich, dass es im Bereich der Aminosäuren 14–26 zu stark verringerten Intensitäten kommt, diese jedoch auf maximal ein Viertel reduziert sind und somit dennoch gut detektiert werden können.

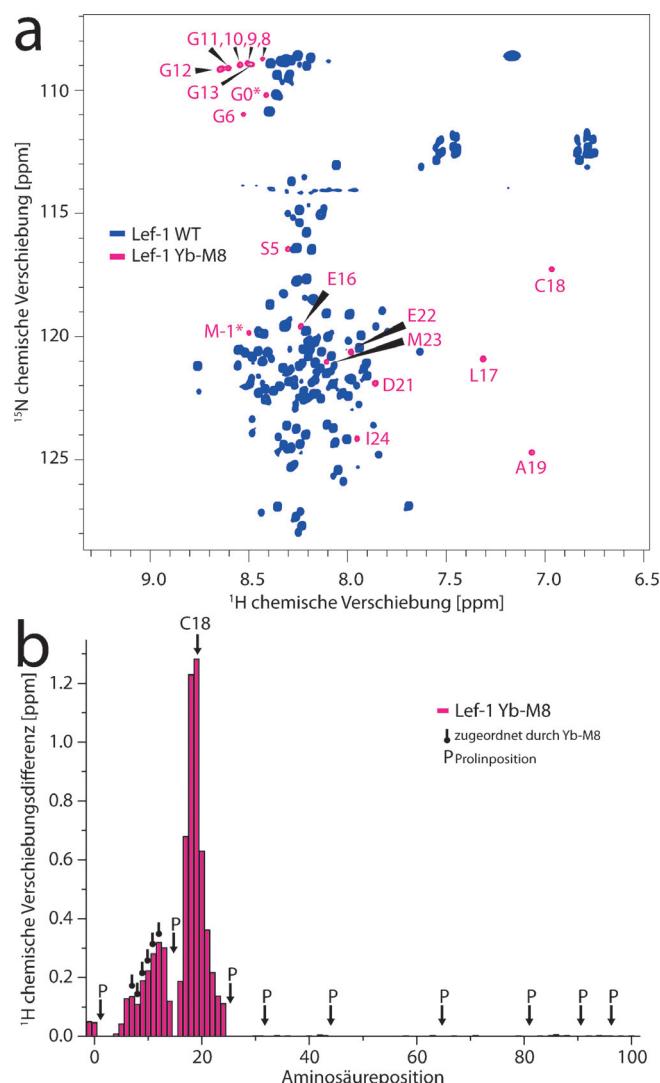


Abbildung 2. Spektrale Änderungen durch Einführung des Yb-M8-Komplexes in Lef-1 (1–101). a) Überlagerung der ¹H-{¹⁵N}-HSQC-Spektren der Referenzprobe (blau) und der Yb-M8-gebundenen Probe (b). Die Proteinkonzentrationen betragen jeweils 200 μM und die Daten wurden auf einem 900-MHz-Spektrometer mit denselben Einstellungen aufgenommen (8 kumulative Scans, 128 komplexe Datenpunkte, 1 s Magnetisierungsaufbaudauer). Mit einem Stern (*) markierte Signale stellen keine nativen Lef-1-Signale dar, sondern stammen von einer Proteaseerkennungssequenz (siehe Hintergrundinformationen). b) Absolute Werte der Änderungen der ¹H-chemischen Verschiebung nach Bindung des Komplexes. Signale, die nur durch die Einführung des Yb-M8-Komplexes zugeordnet werden konnten, sind markiert; Prolinreste sind mit P gekennzeichnet.

Die kovalente Bindung des Yb-M8-Komplexes stellt somit eine generelle Möglichkeit dar, starke Signalüberlappungen in unstrukturierten Proteinen und Bereichen zu verringern. Um die weitreichenden Einsatzmöglichkeiten dieser Methode aufzuzeigen, wurde eine mit Yb-M8 gebundene und nun im Spektrum gut aufgelöste FUS-Probe mit einem Wechselwirkungspartner versetzt. Dabei wurde das 110 kDa große Protein Transportin-1 hinzutitriert, vom dem gezeigt wurde, dass es den C-Terminus von FUS bindet,^[22] aber neueste Erkenntnisse weisen auch auf eine Rolle der RGG-

Region bei der Bindung hin.^[18,23] Wie in Abbildung S8 sichtbar ist, wurde es durch die erhöhte Dispersion von FUS nun möglich, die aminosäurespezifische Wechselwirkung von gut separierten Signalen zu erfassen. Die gezeigten Reste waren im Referenzspektrum zu stark überlagert, um eine eindeutige Zuordnung durchführen zu können, durch die Einführung des PCS-Effekts konnte aber erstmals die direkte Wechselwirkung der RGG-Region mit Transportin-1 nachgewiesen werden.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Einführung des Komplexes zu stark verbesserter Dispersion und vereinfachter Signalzuordnung führt. Cysteine sind in aller Regel in unstrukturierten Regionen stark unterrepräsentiert, können aber durch einfache genetische Methoden in die jeweiligen Proteine eingeführt werden.^[24] Es ist durchaus möglich, für längere Regionen mehrere Mutationen gleichzeitig einzuführen und somit längere Proteinsequenzen gut aufzulösen. Dabei sollte jedoch wie bei anderen kovalenten Modifikationen auch darauf geachtet werden, dass der eingefügte Komplex die Resultate nicht verzerrt. Der verwendete M8-Komplex ist jedoch sehr gut wasserlöslich und weitgehend polar, was im Vergleich mit beispielsweise hydrophoben Aminoxylgruppen eine sicherere Anwendung darstellt.^[12,25] Wir präsentieren somit eine einfache Möglichkeit, mittels eines paramagnetischen Ytterbiumkomplexes die chemischen Verschiebungen von unstrukturierten Proteinen und Niedrigfrequenzregionen zu erhöhen. Es konnte gezeigt werden, dass die somit erhaltenen Daten eine einfache und stabile Analyse ermöglichen. Diese Methode stellt eine signifikante Verbesserung zur Erforschung intrinsisch unstrukturierter Proteine und Proteinregionen dar, vor allem im Hinblick auf das genomweite häufige Auftreten von unstrukturierten Proteinen und Proteinregionen.

Danksagung

Teile dieser Arbeit wurden durch das Inramural Research Program des NIH, NHLBI unterstützt. T.M. wurde durch das Bayerische Staatsministerium für Bildung und Kultus, Wissenschaft und Kunst (Bavarian Molecular Biosystems Research Network), die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Emmy-Noether Programm MA 5703/1-1), das CIPSM (Center for Integrated Protein Science Munich) und den Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF: P28854, W1226-B18) unterstützt. Wir danken der Imaging Probe Development Group des NIH für die Synthese des Yb-M8-Komplexes und Ashley C. Barnes, Sam Asami und Vanessa Morris für deren hilfreiche Kommentare zum Manuscript.

Stichwörter: Chemische Verschiebungsdispersion · Intrinsic unstrukturierte Proteine · Kernspinresonanz · Lanthanoide · Pseudo-chemische Verschiebung

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 14847–14851
Angew. Chem. **2016**, *128*, 15069–15073

- [1] H. J. Dyson, P. E. Wright, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 197–208.
- [2] a) F.-X. Theillet, A. Binolfi, T. Frembgen-Kesner, K. Hingorani, M. Sarkar, C. Kyne, C. Li, P. B. Crowley, L. Giersch, G. J. Pielak, A. H. Elcock, A. Gershenson, P. Selenko, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 6661–6714; b) P. E. Wright, H. J. Dyson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, *16*, 18–29; c) R. van der Lee, M. Buljan, B. Lang, R. J. Weatheritt, G. W. Daughdrill, A. K. Dunker, M. Fuxreiter, J. Gough, J. Gsponer, D. T. Jones, P. M. Kim, R. W. Kriwacki, C. J. Oldfield, R. V. Pappu, P. Tompa, V. N. Uversky, P. E. Wright, M. M. Babu, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 6589–6631; d) V. N. Uversky, V. Davé, L. M. Iakoucheva, P. Malaney, S. J. Metallo, R. R. Pathak, A. C. Joerger, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 6844–6879.
- [3] a) P. Tompa, *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 527–533; b) P. Romero, Z. Obradovic, C. R. Kissinger, J. E. Villafranca, S. Guilliot, E. Garner, A. K. Dunker, *Pac. Symp. Biocomput.* **1998**, *3*, 437–448.
- [4] a) M. Kjaergaard, F. M. Poulsen, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2012**, *60*, 42–51; b) *Intrinsically Disordered Proteins Studied by NMR Spectroscopy* (Hrsg.: I. C. Felli, R. Pierattelli), Springer International Publishing, Schweiz, **2015**; c) H. J. Dyson, P. E. Wright, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3607–3622; d) S. Kosol, S. Contreras-Martos, C. Cedeño, P. Tompa, *Molecules* **2013**, *18*, 10802; e) M. R. Jensen, M. Zweckstetter, J.-r. Huang, M. Blackledge, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 6632–6660.
- [5] S. Schwarzsinger, G. J. A. Kroon, T. R. Foss, J. Chung, P. E. Wright, H. J. Dyson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2970–2978.
- [6] M. D. Mukrasch, S. Bibow, J. Korukottu, S. Jeganathan, J. Biernat, C. Griesinger, E. Mandelkow, M. Zweckstetter, *PLoS Biol.* **2009**, *7*, e1000034.
- [7] a) A. Zawadzka-Kazimierczuk, W. Koźmiński, H. Šanderová, L. Krásný, *J. Biomol. NMR* **2012**, *52*, 329–337; b) V. Motáčková, J. Nováček, A. Zawadzka-Kazimierczuk, K. Kazimierczuk, L. Žídek, H. Šanderová, L. Krásný, W. Koźmiński, V. Sklenář, *J. Biomol. NMR* **2010**, *48*, 169–177; c) R. L. Narayanan, U. H. N. Dürr, S. Bibow, J. Biernat, E. Mandelkow, M. Zweckstetter, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11906–11907; d) A. Piai, T. Hošek, L. Gonnelli, A. Zawadzka-Kazimierczuk, W. Koźmiński, B. Brutscher, W. Bermel, R. Pierattelli, I. Felli, *J. Biomol. NMR* **2014**, *60*, 209–218; e) I. Bagai, S. Ragsdale, E. P. Zuiderweg, *J. Biomol. NMR* **2011**, *49*, 69–74.
- [8] a) T. E. Machonkin, W. M. Westler, J. L. Markley, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5413–5426; b) W. Bermel, M. Bruix, I. Felli, V. M. V. Kumar, R. Pierattelli, S. Serrano, *J. Biomol. NMR* **2013**, *55*, 231–237; c) I. C. Felli, R. Pierattelli, *IUBMB Life* **2012**, *64*, 473–481; d) W. Bermel, I. Bertini, I. C. Felli, Y.-M. Lee, C. Luchinat, R. Pierattelli, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3918–3919; e) W. Bermel, I. C. Felli, R. Kümmerle, R. Pierattelli, *Concepts Magn. Reson. Part A* **2008**, *32*, 183–200.
- [9] M. Gal, K. A. Edmonds, A. G. Milbradt, K. Takeuchi, G. Wagner, *J. Biomol. NMR* **2011**, *51*, 497–504.
- [10] a) S. Źerko, W. Koźmiński, *J. Biomol. NMR* **2015**, *63*, 283–290; b) I. C. Felli, B. Brutscher, *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 1356–1368; c) S. Hiller, C. Wasmer, G. Wider, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10823–10828; d) S. Hiller, F. Fiorito, K. Wüthrich, G. Wider, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 10876–10881; e) M. Nowakowski, S. Saxena, J. Stanek, S. Źerko, W. Koźmiński, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2015**, *90*–91, 49–73; f) M. Mobli, J. C. Hoch, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2014**, *83*, 21–41.
- [11] a) A. Coletta, J. W. Pinney, D. Y. W. Solís, J. Marsh, S. R. Pettifer, T. K. Attwood, *BMC Syst. Biol.* **2010**, *4*, 43; b) B. Kumari, R. Kumar, M. Kumar, *Mol. BioSyst.* **2015**, *11*, 585–594.
- [12] C. Göbl, T. Madl, B. Simon, M. Sattler, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2014**, *80*, 26–63.
- [13] G. Otting, *Annu. Rev. Biophys.* **2010**, *39*, 387–405.

- [14] a) B. Graham, C. T. Loh, J. D. Swarbrick, P. Ung, J. Shin, H. Yagi, X. Jia, S. Chhabra, N. Barlow, G. Pintacuda, T. Huber, G. Otting, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2118–2125; b) M. D. Vlasie, C. Comuzzi, A. M. C. H. van den Nieuwendijk, M. Prudêncio, M. Overhand, M. Ubbink, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 1715–1723; c) P. H. J. Keizers, A. Saragliadis, Y. Hiruma, M. Overhand, M. Ubbink, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14802–14812.
- [15] D. Häussinger, J.-r. Huang, S. Grzesiek, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14761–14767.
- [16] A. C. L. Opina, M. Strickland, Y.-S. Lee, N. Tjandra, R. Andrew Byrd, R. E. Swenson, O. Vasalatiy, *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 4673–4687.
- [17] E. Bentmann, C. Haass, D. Dormann, *FEBS J.* **2013**, *280*, 4348–4370.
- [18] D. Dormann, T. Madl, C. F. Valori, E. Bentmann, S. Tahirovic, C. Abou-Ajram, E. Kremmer, O. Ansorge, I. R. A. Mackenzie, M. Neumann, C. Haass, *EMBO J.* **2012**, *31*, 4258–4275.
- [19] N. Vasilyev, A. Polonskaia, J. C. Darnell, R. B. Darnell, D. J. Patel, A. Serganov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, E5391.
- [20] S. Grzesiek, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1992**, *99*, 201–207.
- [21] National Institutes of Health, NIDDK, http://spin.niddk.nih.gov/bax/nmrserver/Poulsen_rc_CS (accessed January 14, 2016).
- [22] Z. C. Zhang, Y. M. Chook, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 12017–12021.
- [23] M. Suárez-Calvet, M. Neumann, T. Arzberger, C. Abou-Ajram, E. Funk, H. Hartmann, D. Edbauer, E. Kremmer, C. Göbl, M. Resch, B. Bourgeois, T. Madl, S. Reber, D. Jutzi, M.-D. Ruepp, I. R. A. Mackenzie, O. Ansorge, D. Dormann, C. Haass, *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*, 587–604.
- [24] R. M. Williams, Z. Obradović, V. Mathura, W. Braun, E. C. Garner, J. Young, S. Takayama, C. J. Brown, A. K. Dunker, *Pac. Symp. Biocomput.* **2001**, *6*, 89–100.
- [25] A. Bernini, V. Venditti, O. Spiga, N. Niccolai, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2009**, *54*, 278–289.

Eingegangen am 27. Juli 2016,
veränderte Fassung am 16. September 2016
Online veröffentlicht am 20. Oktober 2016