

Kompensatorische Anpassungen der strukturellen Dynamik eines intrinsisch unstrukturierten Protein-Komplexes**

Dennis Kurzbach, Thomas C. Schwarz, Gerald Platzter, Simone Höfler, Dariush Hinderberger* und Robert Konrat*

Abstract: Intrinsisch unstrukturierte Proteine (IUPs) spielen eine zentrale Rolle in Proteininteraktionsnetzwerken als wichtige Knotenpunkte und Kopplungsstellen. Hier zeigen wir mit einer Kombination aus NMR- und ESR-Spektroskopie, dass die Bindung des Cytokins Osteopontin an seinen natürlichen Liganden Heparin von thermodynamisch kompensierend wirkenden Strukturanpassungen begleitet wird: Das Kernsegment des OPN entfaltet sich, und dieses „Entfalten durch Bindung“ kompensiert entropische Verluste durch die Heparinbindung. Es wird gezeigt, dass dieser Prozess primär durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Heparin und geladenen Regionen entlang des Proteinrückgrats bestimmt wird. Dieses Wechselspiel zwischen Struktur und Thermodynamik ist auch von grundlegender Bedeutung für IUPs zur schnellen Substratbindung und -freisetzung innerhalb von Wechselwirkungsnetzwerken.

Trotz fehlender definierter Tertiärstruktur erfüllen intrinsisch unstrukturierte Proteine essentielle Aufgaben in eukaryotischen Organismen.^[1] Ihre strukturelle Flexibilität erlaubt ihre Einbindung in Proteininteraktionsnetzwerke und die Interaktion mit vielen Bindungspartnern.^[2] Jedoch erschwert diese hohe Flexibilität auch ihre Untersuchung. Die NMR-Spektroskopie hat sich als eine wertvolle experimentelle Methode zur Charakterisierung von IUPs und ihrer Komplexe in Lösung erwiesen.^[3] Die Bindungsmodalitäten zwischen IUPs und ihren Liganden wurden jedoch bisher nur unzureichend beschrieben. Verschiedene Bindungsmecha-


nismen wurden dabei unterschieden, darunter „Falten durch Binden“,^[4] wobei das IUP eine bestimmte Konformation annimmt, wenn es mit einem Liganden wechselwirkt, oder die Bildung „unscharfer“ Komplexe, in denen das IUP viele unterschiedliche Konformationen auf der Oberfläche eines Bindungspartners einnehmen kann.^[5] Da IUPs typischerweise höher geladen sind als globuläre Proteine, sind elektrostatische Interaktionen hier häufig zentral für die Protein-Ligand-Wechselwirkungen eines IUP.^[6] Tatsächlich sind spezifische Ladungsmuster einiger IUPs bekannt, die zur Anziehung von und Interaktion mit natürlich geladenen Substraten optimiert sind.^[7] Hier bieten wir durch die Kombination von NMR- und Elektronenspinresonanz(ESR)-Spektroskopie neue Einblicke in die Feinheiten der Strukturanpassungen, die bei IUP-Substrat-Erkennungsprozessen auftreten. Während NMR-Messungen Informationen über Struktur (PRE; paramagnetische Relaxationsverstärkung) und Dynamik (NMR-Spinrelaxation) mit der Auflösung einzelner Aminosäuren liefern, bietet ESR grobmaschige Informationen über Strukturanpassungen von IUPs.^[8] Wir analysieren die Interaktion des IUP Osteopontin (OPN), eines extrazellulären Matrixproteins, das mit der Metastase verschiedener Krebsarten in Verbindung gebracht wird,^[9] mit Heparin,^[8f] einem stark sulfatierten Glycosaminoglykan, das oft als Antikoagulans eingesetzt wird. Im biologischen Kontext ist die Bindung von Heparin an OPN interessant, weil sie die OPN-Heparansulfat- bzw. OPN-Hyaluronsäure-Wechselwirkung reproduziert, die wahrscheinlich in der OPN-CD44-Rezeptorassoziation eine Rolle spielt – einem Prozess, der in Zellsignaltransduktion und -adhäsion eingebunden ist (der CD44-Rezeptor ist ein Heparansulfatproteoglykon (HSPG), das unterschiedliche heparinbindende Wachstumsfaktoren und Chemokine absondert).^[9b] Glycosaminoglykane wie Heparin, Hyaluronan und Heparansulfat sind weiterhin zentral für die Chemokinfunktion in vivo.^[9c,d] Außerdem sind Interaktionen zwischen IUPs und biologischen Polyelektrolyten relativ häufig,^[1b] und unsere Resultate sind daher auch auf andere Systeme übertragbar. Wir zeigen, dass OPN nach der Bindung an Heparin weitestgehend unstrukturiert bleibt, auch wenn sich das Strukturensamble verändert. Die kompensatorischen Adaptionen, die bei OPN als Folge der Heparinbindung beobachtet werden, werden hauptsächlich durch elektrostatische Wechselwirkungen bestimmt und demonstrieren eindrucksvoll, wie entropische Verluste, die durch lokal bedingtes Verfestigen der Aminosäuren in den Ligandenbindungsstellen entstehen, durch partielles Entfalten von Peptidsegmenten außerhalb der Bindungsstellen aufgehoben werden können. Diese Einsichten könnten sich als wichtig erweisen, um die Interpretation des bisher noch

[*] Dr. D. Kurzbach,^[†] T. C. Schwarz,^[†] G. Platzter, S. Höfler, Prof. R. Konrat
Department of Structural and Computational Biology
Max F. Perutz Laboratories
Vienna Biocenter Campus 5, 1030 Wien (Österreich)
E-Mail: robert.konrat@univie.ac.at

Prof. D. Hinderberger
Institut für Chemie, physikalische Chemie (komplexe selbstorganisierende Systeme)
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Von-Danckelmann-Platz 4, 06120 Halle (Saale) (Deutschland)
E-Mail: dariush.hinderberger@chemie.uni-halle.de

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

[**] Wir danken Christian Bauer für technische Hilfe, Prof. Hans W. Spiess für fortwährende Unterstützung und dem FWF (W-1221-B03) für Fördermittel. D.K. dankt für ein Feodor-Lynen-Stipendium der Humboldt-Stiftung und für Förderung durch die Gutenberg-Akademie der Universität Mainz. Das Expressionsplasmid für den OPN-Wildtyp wurde vom Arbeitskreis Professor K. Bister (Universität Innsbruck) zur Verfügung gestellt.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201308389> zu finden.

weitestgehend unverstandenen Wechselspiels zwischen Struktur und Thermodynamik der schnellen Bindungs- und Freisetzungprozesse von Substraten in IUP-Interaktionsnetzwerken zu erleichtern.

Wir untersuchen eine 220 Aminosäuren lange Mutante des OPN-Proteins (AA 45–264 des nativen OPN plus ein N-terminales Met). In Abbildung 1a werden Veränderungen der paramagnetischen Relaxationsverstärkung, ΔPRE , für vier spinmarkierte Cys-Mutanten des IUP gezeigt, die durch die Heparinbindung hervorgerufen werden (Spinmarkierung mit MTSL; *S*-(2,2,5,5-Tetramethyl-2,5-dihydro- ^1H -pyrrol-3-yl)methylmethansulfonothioat, Mutanten C54, C108, C188 und C247). Die ΔPRE errechnen sich aus der Veränderung der relativen (markiert/Wildtyp) Signalintensität im ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektrum (Höhe) durch die Heparinbindung an OPN (MTSL-Protein-Interaktion wurden durch Referenzmessungen

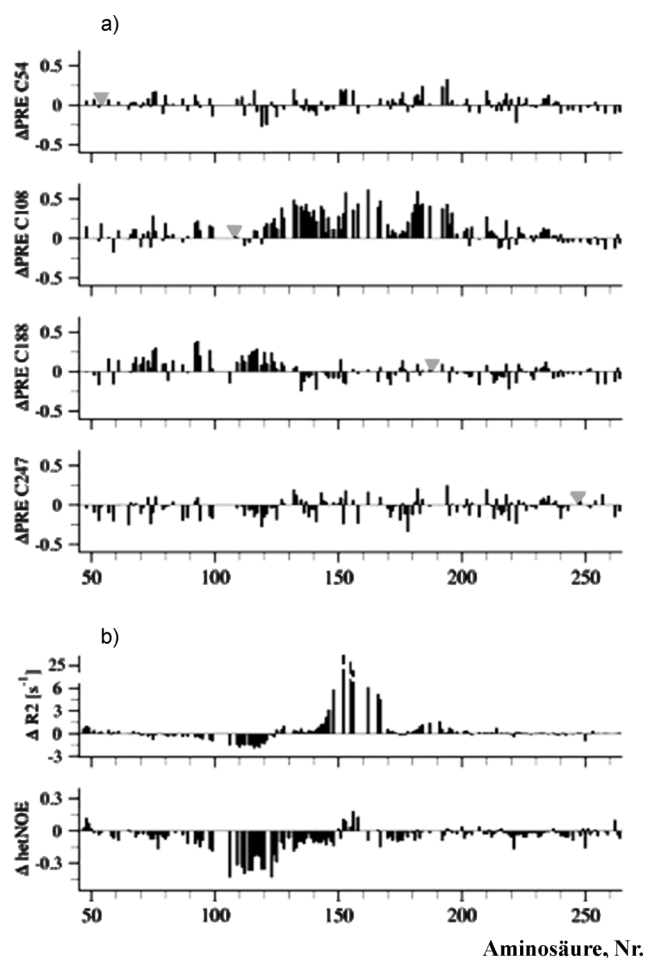


Abbildung 1. a) ΔPRE -Werte nach Heparinbindung für die vier unterschiedlichen Markierungsstellen, entsprechend der Differenzen in den ^{15}N - ^1H -HSQC-Signalintensitäten. (Der ΔPRE -Wert ist die relative (OPN-MTSL/OPN) ^{15}N - ^1H -HSQC-Intensität des heparin gebundenen Zustand minus der relativen ^{15}N - ^1H -HSQC-Intensität des apo-Zustands). $\Delta\text{PREs} > 0$ weisen auf größer werdende Abstände zu den Markierungsstellen (graue Pfeile) im gebundenen Zustand hin; $\Delta\text{PREs} < 0$ weisen auf kleiner werdende Abstände hin. Fehlerabschätzungen können in den Hintergrundinformationen gefunden werden. b) ΔR_2 und ΔhetNOE (^{15}N - ^1H -NOE-Differenzen („gebunden minus apo“) pro Aminosäureposition. Fehlerabschätzungen können in den Hintergrundinformationen gefunden werden.

gen ausgeschlossen; Details in den Hintergrundinformationen). Bei der Interpretation von PRE-Daten von IUPs ist zu berücksichtigen, dass durch die raschen Konformationswechsel der IUPs nur ensemblemittelte PRE-Daten erhoben werden können.^[8a] Deshalb beziehen sich alle Schlussfolgerungen, die sich aus diesen Daten ergeben, nur auf „gemittelte“ Konformationen und $\Delta\text{PRE} > 0$ weist auf „im Mittel“ größer werdende Distanzen zwischen einer Markierungsstelle und einer Aminosäure infolge der Bindung hin. Für $\Delta\text{PRE} < 0$ ist die Situation umgekehrt.^[8f] Wie aus Abbildung 1a ersichtlich ist, reagiert das IUP mit differentiellen Veränderungen von Rückgratinteraktionen längerer Reichweite auf die Heparinbindung. Spinmarker an Aminosäuren C108 und C188 entfernen sich von der Kernregion des Proteins, d.h. von Aminosäuren 120–200 im Falle von C108 und von 70–120 im Falle von C188. Zusammenfassend zeigen die PRE-Daten, dass sich das zentrale Segment (AA 90–150) von OPN entfaltet, sobald Heparin gebunden wird, vergleichbar mit einem „Entfalten durch Bindung“-Prozess. Intermolekulare PRE-Effekte wurden durch ein Kontrollexperiment ausgeschlossen, in dem eine Mischung aus ^{14}N - und MTSL-markiertem OPN und ^{15}N -, aber nicht MTSL-markiertem OPN eingesetzt wurde (Details in den Hintergrundinformationen).

Differentielle Änderungen der strukturellen Kompaktheit der zentralen OPN-Region wurden durch ^{15}N -Relaxationsmessungen (^{15}N - R_1 und ^{15}N - R_2 -Messungen (R_1 , R_2 = longitudinale bzw. transversale Relaxationsrate) sowie ^{15}N - ^1H -hetNOE-Messungen ^{15}N - ^1H -heteronuklearer Kern-Overhauser-Effekt) im apo-Zustand (ohne Ligand) und im heparin gebundenen Zustand bestimmt. Abbildung 1b zeigt einen Sequenzplot von ^{15}N - R_2 - und heteronukleare ^{15}N - ^1H -NOE-Differenzen. Diejenigen Regionen, die den Großteil der Heparinbindungsstelle beinhalten (AA 140–170 und AA 180–200), zeigen steigende ^{15}N - R_2 -Werte durch Heparinbindung und die dadurch bewirkte lokale Festigung des Proteinrückgrats (Bewegung auf der ns-Zeitskala). Gleichzeitig geben reduzierte ^{15}N - ^1H -NOE-Werte (Abbildung 1b, unten) Hinweise auf eine reduzierte Beweglichkeit im ps-Bereich. Demgegenüber wurde eine größere Rückgratflexibilität in der Region zwischen den Aminosäuren 90 und 120 festgestellt (verringerte R_2 -Raten und negativere heteronukleare NOEs). Der Befund, dass Aminosäuren 90–120 im heparin gebundenen Zustand flexibler sind, ist in Einklang mit verringerten PRE-Werten und bestätigt unabhängig, dass sich dieser Teil des Proteins von der Heparinbindungsstelle entfernt und somit im Komplex auch weniger eingezwängt ist. Insgesamt zeigen die NMR-Relaxationsdaten, dass das OPN im gebundenen Zustand eine erhöhte konformationelle Freiheit aufweist. Die Heparinbindung wurde außerdem durch DOSY-NMR bestätigt, die eine Vergrößerung des hydrodynamischen Radius von 3.6 nm auf 5.2 nm durch die Heparinbindung zeigte.

Zur Komplementierung der NMR-Daten von Osteopontin haben wir CW-ESR-Messungen (CW: continuous wave) bei Raumtemperatur an den vier vorhandenen Punktmutanten und DEER-Messungen (DEER: double electron-electron resonance) an sechs spinmarkierten Cystein-OPN-Doppelmutanten durchgeführt. DEER wurde bei der Glasüber-

gangstemperatur (50 K) an schockgefrorenen Proben gemessen. Das dabei erhaltene Ensemble kann als repräsentativ für die Lösung angenommen werden (weitere Details dazu in den Hintergrundinformationen). CW-ESR zeigt, dass die an C108 gebundene Spinmarkierung an Mobilität gewinnt, während die Bewegung der Mutante C188 eingeschränkt wird (mit Rotationskorrelationszeiten von $\tau_{c,108} = 0.52$ ns, $\tau_{c,108/\text{Heparin}} = 0.43$ ns, $\tau_{c,188} = 0.69$ ns und $\tau_{c,188/\text{Heparin}} = 0.87$ ns; Details in den Hintergrundinformationen). Die Bewegungskorrelationszeiten τ_c der Spinmarkierungen an C54 und C247 scheinen durch die Bindung von Heparin nicht signifikant verändert zu werden. Die erhöhte Rotationsfreiheit des MTSL an C108 ist ein weiteres Indiz für die starke Lösungsmittelexposition dieser Stelle, welche aus der Expansion des Kernelements des OPN resultiert.^[10] Man beachte, dass die mittels CW-ESR gemessenen τ_c -Werte (ähnlich denjenigen, die man aus NMR-Daten erhält) von nicht separierbaren lokalen und globalen Bewegungsmoden beeinflusst werden und daher nur effektiven Korrelationszeiten entsprechen. Um die Veränderung der Korrelationszeiten durch die Bindung von Heparin eindeutig zu zeigen, sind sowohl NMR- (R_2 und hetNOE) als auch ESR-Daten notwendig.

Während eine detaillierte Analyse der DEER-Zeitspuren von OPN im freien Zustand bereits publiziert wurde,^[11] wurden die DEER-Daten hier sowohl im heparingebundenen als auch im freien Zustand gemessen. Alle DEER-Rohdaten können den Hintergrundinformationen entnommen werden. DEER-Daten von strukturell heterogenen IUPs sind aufgrund eines Mangels an Signalmodulation schwer auswertbar. Dies wurde im Detail und andernorts bereits beschrieben.^[8d,11] Aus diesem Grund wurden die Zeitspuren mittels einer effektiven Modulationstiefe, Δ_{eff} , wie in unserer vorangehenden Publikation beschrieben, analysiert.^[11] Der effektive Signalverlust Δ_{eff} nach der experimentellen DEER-Evolutionszeit ist ein ungefähres Maß für die Interspindistanz R in breiten Abstandsverteilungen, $P(R)$ (siehe Hintergrundinformationen)^[11] und sinkt für größer werdende R zwischen zwei Markierungsstellen. Die untere Detektionsgrenze dieser Methode liegt bei 1–1.6 nm in wässriger Lösung, und die Annahme sinkender Δ_{eff} bei steigender mittlerer Distanz von $P(R)$ ist nur im Fall von Doppelmутanten mit sehr breitem Konformationsensemble, also auch breitem $P(R)$, gültig.^[11] Unser Ansatz ist daher hauptsächlich für große, extendierte Proteine wie OPN einsetzbar. (Man beachte, dass PRE-Daten hinsichtlich ihrer Längenskalen zu DEER komplementär sind. PRE-Daten sind in unserem System nur unterhalb 2–3 nm effektiv. Daher müssen selbst signifikante Veränderungen in Δ_{eff} nicht unbedingt mit Veränderungen von PRE-Daten korrelieren). Des Weiteren sind experimentelle DEER-Hintergrundfunktionen zur korrekten Datenhandhabung notwendig. Wir merken an, dass in gefalteten Proteinen, welche oft starke Modulationen in den DEER-Zeitspuren aufweisen, eine Analyse mittels Δ_{eff} nicht möglich wäre. In Abbildung 2 sind Δ_{eff} -Werte für sechs Doppelmутanten im apo-Zustand und im heparingebundenen Zustand gezeigt (ESR-Rohdaten finden sich in den Abbildungen S2 und S3 in den Hintergrundinformationen). In allen Fällen führt die Bindung von Heparin zu einer eindeutigen Reduktion von Δ_{eff} , was auf größere Distanzen zwischen den

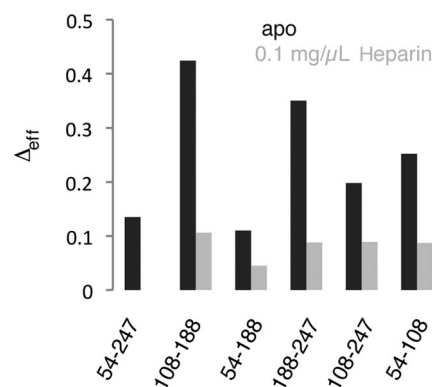


Abbildung 2. Δ_{eff} -Werte für die sechs OPN-Doppelmутanten im apo-Zustand (schwarz) und im heparingebundenen Zustand (grau). Δ_{eff} der Mutante 54–247 mit Heparin ist 0.

Markierungen der Doppelmутanten hinweist. Diese Ergebnisse bestätigen die durch NMR-Spektroskopie festgestellte Expansion des OPN durch Heparinbindung und zeigen unabhängig die Entfaltung durch Bindung.

Die beobachtete durchschnittliche Expansion der zentralen Region von OPN durch Bindung an Heparin ist gut verständlich, wenn man bedenkt, dass Heparin ein stark negativ geladener Polyelektrolyt ist, welcher hauptsächlich elektrostatisch mit seiner Umgebung interagiert. Abbildung 3 zeigt die Ladungsverteilung innerhalb des OPN, wobei Regionen hoher Ladungskonzentration hervorgehoben sind. Es wurde bereits gezeigt, dass Heparin über elektrostatische Interaktionen an die positiv geladene Region des OPN rund um Aminosäure 155 bindet.^[8f,11] Die negativ geladene Region 80–120 jedoch wird aller Wahrscheinlichkeit nach vom ebenfalls negativ geladenen Heparin aus der zentralen Region verdrängt. Dies führt zur beobachteten Expansion und den in Abbildung 1 a gezeigten positiven ΔPRE -Werten. In der ungebundenen Form existiert eine elektrostatische Anziehung zwischen der positiv geladenen Region (um Position 155) und dem negativ geladenen Segment 80–120, die den Kern des OPN kompaktiert.^[11] Somit sehen wir im OPN-Heparin-Komplex einen elektrostatischen Bindungsmodus, der durch komplementäre Ladungsmuster bestimmt wird und ein häufig vorkommendes molekulares Erkennungsmuster darstellt.^[12] Dieser Bindungsmodus wurde durch Messung der Änderungen der chemischen Verschiebung, der PRE-Daten (siehe Abbildung S6) und der DOSY-Daten bei verschiedenen Ionenstärken bestätigt. Die beobachteten Veränderungen der chemischen Verschiebung sowie des Hydratationsradius R_H bei hohen Salzkonzentrationen zeigen eine salzinduzierte Dissoziation von OPN und Heparin an (R_H OPN: 3.6 nm; OPN-Heparin: 5.2 nm, OPN-Heparin/400 mM NaCl: 3.4 nm).

Die Bindung von Heparin an OPN wurde auch mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) untersucht. Aus

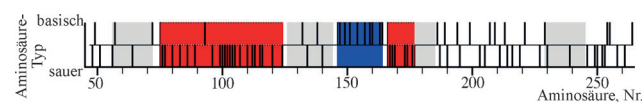


Abbildung 3. Ladungsverteilung im OPN. Neutrale Regionen sind grau, saure (negativ geladen beim experimentellen pH-Wert) rot und basische (positive geladen) blau dargestellt.

diesen Messungen wurden Werte für ΔH und ΔS von $-16.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ und $35 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ermittelt, unter der Annahme, dass Heparin ein durchschnittliches Molekulargewicht von 17.5 kDa hat. Die relativ großen Werte für ΔH und ΔS heben sich bei 293 K fast vollständig auf ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S \approx 0$). Die Dissoziationskonstante beträgt $34 \mu\text{M}$ (Details siehe Hintergrundinformationen). Zusätzlich konnten wir durch Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen eine positive Wärmekapazität ΔC_p (ca. $40 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) für die Bindung ermitteln. Auch dies stützt die Annahme der erhöhten Flexibilität des OPN durch Bindung. Die Unterdrückung der Komplexbildung bei hoher Salzkonzentration konnten wir ebenfalls per ITC zeigen (Abbildung S7).

Zusammenfassend konnten wir mithilfe von NMR- und EPR-Messungen zeigen, dass die Bindung von Heparin zu einer Expansion der zentralen Regionen des Proteins Osteopontin führt. Der Interaktionsmodus dieses intrinsisch ungeordneten Proteins mit seinem Liganden kann somit als „unscharfer“ Komplex (teilweise erhaltene konformationelle Flexibilität im gebundenen Zustand) beschrieben werden. Auch wenn in der Bindungsstelle des Heparins (Position 155) eine leichte Festigung des Proteinrückgrats zu beobachten ist, wird die daraus resultierende Reduzierung der Entropie durch die erhöhte Flexibilität in der Region 90–120 zumindest größtenteils ausgeglichen. Die lokale (segmentale) Entfaltung und Expansion des Zentrums von OPN trägt somit signifikant zum thermodynamischen Gleichgewicht bei. Solche Kompensationen sind des öfteren bei IUPs zu beobachten, meist zwischen entgegengesetzt wirkenden Beiträgen wie Solvatationsenthalpie, rotatorischem und translatorischem Freiheitsgrad und Konformationsentropie.^[6,14] Wir ziehen den Schluss, dass die Bindung von Heparin an OPN hauptsächlich durch elektrostatische Interaktionen an der Grenzfläche zwischen Ligand und Protein, welche eine komplementäre Ladungsverteilung aufweist, vermittelt wird. Wegen seiner heparinähnlichen chemischen Zusammensetzung kann ein analoger Bindungsmodus für den natürlich vorkommenden OPN-Liganden Heparansulfat angenommen werden. In diesem Zusammenhang ist ein Vergleich unserer Resultate mit den jüngst für die Bindung zwischen Sic1 und Cdc4 gefundenen Ergebnissen hilfreich.^[15] In dieser Studie wurde die konformationelle Mittelung von Sic1 im gebundenen Zustand als relevant für die durch Phosphorylierung induzierte Sensitivität und polyvalente Interaktion erwiesen. Auch wenn die Bindung im Detail unterschiedlich ist, sind entropische kompensatorische Vorgänge in beiden Fällen zu finden (OPN: konformationelle Expansion; Sic1-Cdc4: polyvalente Interaktionen).

IUPs vermitteln Proteininteraktionen in dynamischen Netzwerken; für schnelle und effiziente Reaktionen auf externe Stimuli werden niedrige Energiebarrieren und erleichterte Interkonversionen zwischen verschiedenen Unterformen benötigt. Im Falle von elektrostatisch kontrollierten Bindungsmodi ist dies erleichtert, und die dadurch erreichte konformationelle Plastizität erlaubt wiederum eine einfache Modulation der Lebenszeiten und Interkonversionsgeschwindigkeiten zwischen den verschiedenen gebundenen Zuständen in Begegnungskomplexensembeln.^[16] Daher erwarten wir, dass komplementäre dynamische und strukturelle

Adaptationen, ähnlich den hier für OPN-Heparin beschriebenen, in zellulären Interaktionsnetzwerken aus IUPs beobachtet werden können.

Eingegangen am 25. September 2013,
veränderte Fassung am 14. November 2013
Online veröffentlicht am 6. März 2014

Stichwörter: Intrinsisch unstrukturierte Proteine · Kompensatorische Entropie · NMR-Spektroskopie · Osteopontin · Proteinkomplexe

- [1] a) P. Tompa, *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 527–533; b) J. Dyson, P. E. Wright, *Nat. Rev.* **2005**, *6*, 197–208.
- [2] D. D. Boehr, R. Nussinov, P. E. Wright, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 789–796.
- [3] a) P. R. L. Markwick, T. Malliavin, M. Nilges, *Plos Comput. Biol.* **2008**, *4*, e1000168; b) G. T. Montelione, D. Y. Zheng, Y. P. J. Huang, K. C. Gunsalus, T. Szyperski, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 982–985; c) V. Ozenne, R. Schneider, M. Yao, J.-r. Huang, L. Salmon, M. Zweckstetter, M. R. Jensen, M. Blackledge, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15138–15148.
- [4] H. J. Dyson, P. E. Wright, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 54–60.
- [5] P. Tompa, M. Fuxreiter, *Trends Biochem. Sci.* **2008**, *33*, 2–8.
- [6] V. N. Uversky, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2011**, *43*, 1090–1103.
- [7] a) T. Mittag, J. Marsh, A. Grishaev, S. Orlicky, H. Lin, F. Sicheri, M. Tyers, J. D. Forman-kay, *Structure* **2010**, *18*, 494–506; b) R. Konrat, *Structure* **2010**, *18*, 416–419.
- [8] a) G. M. Clore, C. Tang, J. Iwahara, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2007**, *17*, 603–616; b) G. Jeschke, Y. Polyhach, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 1895–1910; c) J. Iwahara, C. D. Schwieters, G. M. Clore, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5879–5896; d) M. Drescher, *Top. Curr. Chem.* **2012**, *321*, 91–120; e) T. Bund, J. M. Boggs, G. Harauz, N. Hellmann, D. Hinderberger, *Biophys. J.* **2010**, *99*, 3020–3028; f) G. Platzter, A. Schedbauer, A. Chemeli, P. Ozdow, N. Coudeville, R. Auer, G. Kontaxis, M. Hartl, A. J. Miles, B. A. Wallace, O. Glaser, K. Bister, R. Konrat, *Biochemistry* **2011**, *50*, 6113–6124.
- [9] a) A. Bellahcène, V. Castronovo, K. U. E. Ogbureke, L. W. Fisher, N. S. Fedarko, *Nat. Rev.* **2008**, *8*, 212–226; b) H. Ponta, L. Sherman, P. A. Herrlich, *Nat. Rev.* **2003**, *4*, 33–45; c) M. Jones, L. Tussey, N. Athanasou, D. G. Jackson, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 7964–7974; d) J. L. de Paz, E. A. Moseman, C. Noti, L. Polito, U. H. von Andrian, P. H. Seeberger, *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 735–744.
- [10] a) W. Hubbell, D. Cafiso, C. Altenbach, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 735–739; b) W. Hubbell, H. Mchaourab, C. Altenbach, M. Lietzow, *Structure* **1996**, *4*, 779–783.
- [11] D. Kurzbach, G. Platzter, M. Henen, T. Schwarz, R. Konrat, D. Hinderberger, *Biochemistry* **2013**, *52*, 5167–5175.
- [12] a) B. Honig, A. Nicholls, *Science* **1995**, *268*, 1144–1149; b) N. Sinha, S. J. Smith-Gill, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2002**, *3*, 601–614.
- [13] D. Hinderberger, H. W. Spiess, G. Jeschke, *Appl. Magn. Reson.* **2010**, *37*, 657–683.
- [14] K. K. Frederick, M. S. Marlow, K. G. Valentine, A. J. Wand, *Nature* **2007**, *448*, 325–U323.
- [15] a) M. Borg, T. Mittag, T. Pawson, M. Tyers, J. D. Forman-Kay, H. S. Chan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 9650–9655; b) T. Mittag, S. Orlicky, W. Y. Choy, X. Tang, H. Lin, F. Sicheri, L. E. Kay, M. Tyers, J. D. Forman-Kay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 17772–17777.
- [16] D. Kurzbach, W. Hassoun, J. R. McDaniel, E. A. Jaumann, A. Chilkoti, D. Hinderberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11299–11308.