

Festkörper-NMR-Spektroskopie an funktionellen Amyloiden eines Pilz-Hydrophobins: Hinweise auf einen geordneten β -Faltblattkern bei genereller struktureller Heterogenität**

Vanessa K. Morris, Rasmus Linser, Karyn L. Wilde, Anthony P. Duff, Margaret Sunde* und Ann H. Kwan*

Hydrophobine der Klasse I sind kleine, amphipathische Proteine, die sich auf der Oberfläche von Pilzstrukturen wie Lufthyphen und Sporen zu funktionellen Amyloidfibrillen, sogenannten Stäbchen („rodlets“), anordnen. Die Stäbchen bilden eine durch laterale Assoziation zusammengehaltene, höchst robuste Monolage; Dissoziation ist nur durch bestimmte, konzentrierte Säuren möglich. Diese Monolage ist amphipathisch, mit der hydrophoben Seite so wasserabweisend wie Teflon.^[1] In der Biologie der Pilze dient diese Schicht einer Reihe wichtiger Zwecke, so bewirkt sie z. B. den wasserabweisenden Charakter von Sporen und begünstigt Pilz-Wirt-Interaktionen.

Strukturelle Daten zu Hydrophobinen sind sowohl für das Verständnis der molekularen Interaktionen wichtig, die den Stäbchenbildungsprozess definieren, wie auch für das Design von Fungiziden und neuen, auf Hydrophobinen basierenden Nanomaterialien. EAS ist ein Hydrophobin der Klasse I in *Neurospora crassa* (EAS = easily wettable phenotype, da Mutanten ohne das Protein leicht benetzt werden können).^[2] Die Strukturen der löslichen Form von EAS und einer funktionalen, gekürzten Variante, EAS_{Δ15}, sind mithilfe von Lösungs-NMR-Spektroskopie bestimmt worden. Beide zeigen eine für Hydrophobine einzigartige β -Faltblatt-Topologie (Abbildung 1A).^[3] Die Oberfläche weist eine klare Trennung von geladenen und hydrophoben Aminosäureresten auf, welche die Proteine stark amphipathisch und oberflächenaktiv macht (Abbildung 1B). Rekombinant hergestelltes EAS und EAS_{Δ15} bilden an hydrophob/hydrophilen Kontaktflächen spontan Stäbchen-Monolagen mit der glei-

chen geordneten, dicht gepackten Morphologie, wie sie auf Pilzstrukturen beobachtet wird, und derselben Fähigkeit, die Benetzbarkeit von Oberflächen zu invertieren (Abbildung 1C,D). Zirkulardichroismus(CD)-Spektren deuten darauf hin, dass die Stäbchenstrukturen reich an β -Faltblattstruktur sind, während monomeres EAS_{Δ15} nur wenig Sekundärstruktur aufweist (Abbildung 1E).^[3] Genaue Strukturinformationen von Stäbchenmonolagen sind bisher aufgrund ihrer unlöslichen und nicht-kristallinen Natur nicht zugänglich gewesen.

Die Magic-Angle-Spinning(MAS)-Festkörper-NMR-(ssNMR)-Spektroskopie hat sich zur wichtigsten Methode zur Erlangung detaillierter Strukturinformationen fibrillärer Proteine entwickelt,^[4] und in günstigen Fällen können sogar Konformationsensembles charakterisiert werden.^[5] Generell ist nur lokale Ordnung erforderlich, um ssNMR-Spektren ausreichender Qualität zu erhalten und Strukturinformationen ableiten zu können. Neueste Entwicklungen, basierend u. a. auf ¹H-detektierenden heteronuklearen Experimenten, haben ssNMR-Strukturanalysen und Studien zur Dynamik von geordneten Systemen ermöglicht, z. B. für mikrokristalline Proteine^[6] und geordnete Amyloidfibrillen.^[4c,d,7] Diese Methoden fügen einen weiteren Kern als Informationsquelle hinzu und erweitern damit signifikant die spektroskopischen Möglichkeiten.^[8]

ssNMR-Spektren von funktionalem EAS_{Δ15} wurden für doppelt und dreifach markierte EAS_{Δ15}-Stäbchen aufgenommen. Die EAS_{Δ15}-Spektren weisen generell breite Signale auf, was auf konformative Heterogenität hindeutet. Trotz dieser

[*] V. K. Morris,^[†] M. Sunde, A. H. Kwan
School of Medical Sciences and School of Molecular Bioscience
University of Sydney, Sydney (Australien)
E-Mail: ann.kwan@sydney.edu.au
margaret.sunde@sydney.edu.au

R. Linser^[†]
School of Chemistry, University of New South Wales
Sydney (Australien)

R. Linser^[†]
Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology,
Harvard Medical School, Boston (USA)

K. L. Wilde, A. P. Duff
National Deuteration Facility, Australian Nuclear Science and
Technology Organisation, Lucas Heights (Australien)

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

[**] Wir danken Dr. J. Hook, Dr. D. Thomas und Dr. D. Lawes der NMR-Abteilung der University of New South Wales für die Nutzung der

NMR-Spektrometer, Dr. N. Shepherd und B. Crossett für Massenspektrometrie durch die Sydney University Proteome Research Unit und Dr. A. Kondyurin für Hilfe bei Kontaktwinkelmessungen. Wir danken weiterhin für Gerätezugang sowie wissenschaftliche und technische Hilfestellung durch die Electron Microscopy & Microanalysis Research Facility der Electron Microscope Unit, University of Sydney. Das HET-s-Spektrum wurde von Dr. C. Wasmer und Prof. B. Meier zur Verfügung gestellt. Diese Arbeit wurde durch den Australian Research Council (LP0776672 und DP0879121) und das ANSTO Bragg Institute (NDF 1668) finanziell gefördert. M.S. wurde durch ein National Health and Medical Research Council RD Wright Career Development Fellowship, V.M. durch ein University of Sydney Vice-Chancellor's Research Scholarship und R.L. durch einen Australian Research Council Discovery Early Career Research Award gefördert.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201205625> zu finden.

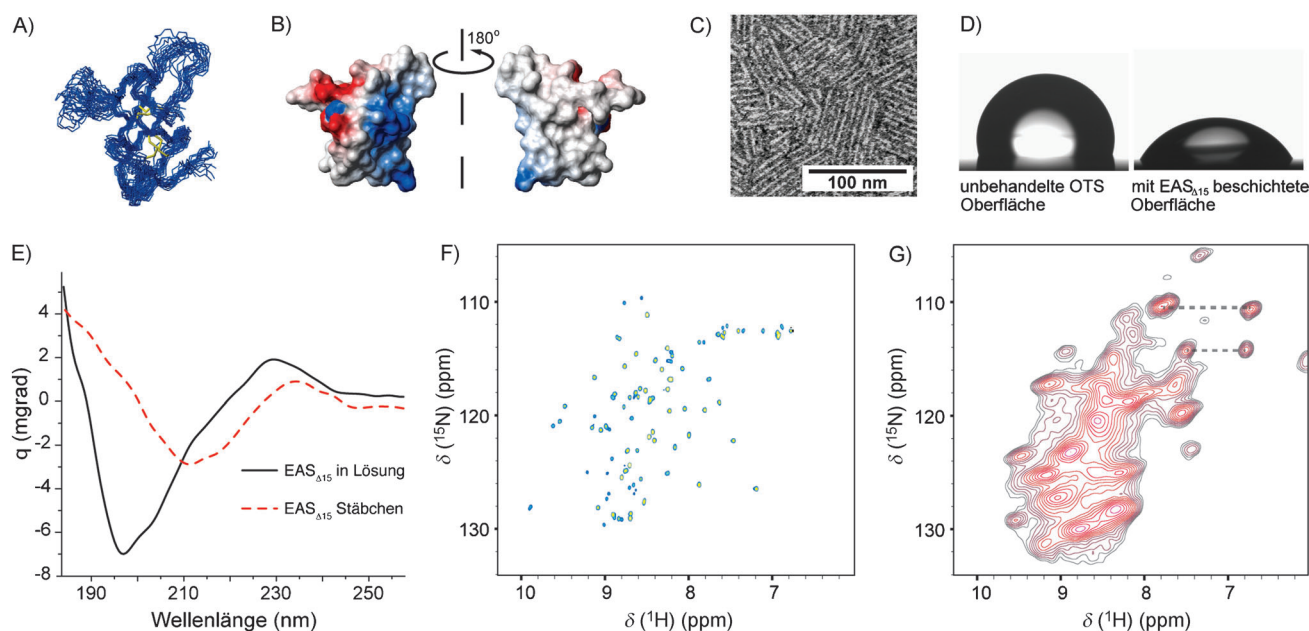


Abbildung 1. Vergleich von Eigenschaften des Hydrophobins EAS $_{\Delta 15}$ in Lösung (Monomer) und im festen Zustand (Stäbchen). A) Übereinandergelegte 20 Strukturen niedrigster Energie von monomerem EAS $_{\Delta 15}$ (PDB-Nummer 2k6a). B) Elektrostatische Oberfläche von monomerem EAS $_{\Delta 15}$. C) TEM-Mikroskopie (Negativkontrast) von EAS $_{\Delta 15}$ -Stäbchen. D) Wassertropfen auf einem mit Octadecyltrichlorsilan (OTS) behandelten Silicium-Wafer und auf einem mit EAS $_{\Delta 15}$ überzogenen und mit OTS behandelten Silicium-Wafer. E) CD-Spektren von EAS $_{\Delta 15}$ in Wasser und von auf einer Quarzküvette getrockneten Stäbchen. Für experimentelle Details siehe Hintergrundinformationen. F) $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ -HSQC-Spektrum von monomerem EAS $_{\Delta 15}$ in Lösung. G) ^1H -detektierende Festkörper- $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ -Korrelation von EAS-Stäbchen unter ähnlichen Pufferbedingungen wie in (F). Gestrichelte Linien deuten auf Resonanzen von Seitenkettenamiden hin.

Heterogenität zeigen sowohl protonendetektierende $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ -Korrelationen von Proben mit verringertem Protonierungsgrad wie auch $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren von protonierten Stäbchen, dass zumindest ein Teil der Resonanzen erstaunlich gut definiert ist. Abbildung 1G zeigt das ssNMR- $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ -Spektrum von deuterierten und partiell ^1H -„rückgetauschten“ Stäbchen. Als Fingerabdruck für das zugrundeliegende Wasserstoffbrückennetzwerk werden $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ -Korrelationen in der Lösungs-NMR-Spektroskopie generell genutzt, um den Faltungszustand von Proteinen zu charakterisieren. Dieser Ansatz ließ sich direkt in die Festkörper-NMR-Spektroskopie übertragen, wobei partiell ^1H -rückgetauschte ^2H , ^{13}C , ^{15}N -markierte Proteinproben eine erhebliche Erleichterung darstellten. In den an EAS-Stäbchen aufgenommenen $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ -Korrelationsspektren sticht eine Untergruppe von Resonanzen aus den übrigen breiten und wenig definierten Resonanzen heraus; diese können stärker herausgehoben werden durch starke Apodisierung oder durch ^1H - T_1 -modulierte Repräsentation (Hintergrundinformationen, Abbildung S4). Diese Beobachtungen deuten auf eine zweifach geartete molekulare Gestalt der EAS $_{\Delta 15}$ -Stäbchen hin, mit einem strukturell konservierten und eng gepackten Kern, umgeben von einem heterogeneren Ensemble konformativ unstrukturierter Regionen.

Ein direkter Vergleich von $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ -Korrelationen von Stäbchen im Festkörper und den Monomeren in Lösung zeigt, dass das Muster der strukturell konservierten Aminosäurereste signifikant von dem Muster in Lösung abweicht (Abbildung 1F,G; siehe Abbildung S5 für übereinandergelegte Spektren). Das Festkörperspektrum zeigt auch neue Signale

von geordneten Gln- oder Asn-Seitenketten, zwei Aminosäuren, die man aus anderen Amyloidstrukturen als Teil intermolekularer Seitenketten-Leiter-Interaktionen kennt.^[9] Diese Veränderungen unterscheiden sich signifikant vom Verhalten solcher Proteine, die ihre Faltung bei Präzipitation nicht verändern,^[10] und zeigen eine substantielle strukturelle Neuordnung bei der EAS $_{\Delta 15}$ -Fibrillenbildung. Für viele dieser markanten und intensiven Signale, die man nur in den Stäbchenspektren findet, stützen sowohl die Signalposition als auch die lokale Dynamik (wie sie sich auf Basis von ^1H - T_1 -Daten und Vergleich von $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ -Korrelationen darstellt, die auf dipolaren bzw. skalaren Magnetisierungstransfers basieren) das Bild einer Bildung von neuen Strukturelementen in den Stäbchen (Abbildung S1C, S4 und S5). Unvollständiger Protonenrücktausch in austauschbare Positionen konnte durch H/D-Austauschexperimente ausgeschlossen werden.

Wegen der allgemein schlechten Auflösung der Spektren und dem geringen Signal-Rausch-Verhältnis war es uns nicht möglich, mithilfe von HNCA/HNCO-^[7] und hC α hNH-^[12] (für partiell ^1H -rückgetauschte, deuterierte Proben) oder NCACX/NCOCX-Experimente^[6a] (für protonierte Proben) sequentielle Zuordnungen zu erhalten. Anstelle dessen wurden $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren verschiedener Mischsequenzen für protonierte EAS $_{\Delta 15}$ -Proben aufgenommen (Abbildung 2, S2 und S3). Diese können mit Spektren vorhergehender ssNMR-Studien an anderen Proteinfibrillen verglichen werden. Die starke strukturelle Heterogenität, die sich in EAS $_{\Delta 15}$ -Stäbchen-Spektren präsentiert (Abbildung 2B), ist mit der Heterogenität vergleichbar, die man für Vollängen-HET-s-Fibrillen findet,^[13] sie ist aber in Kontrast

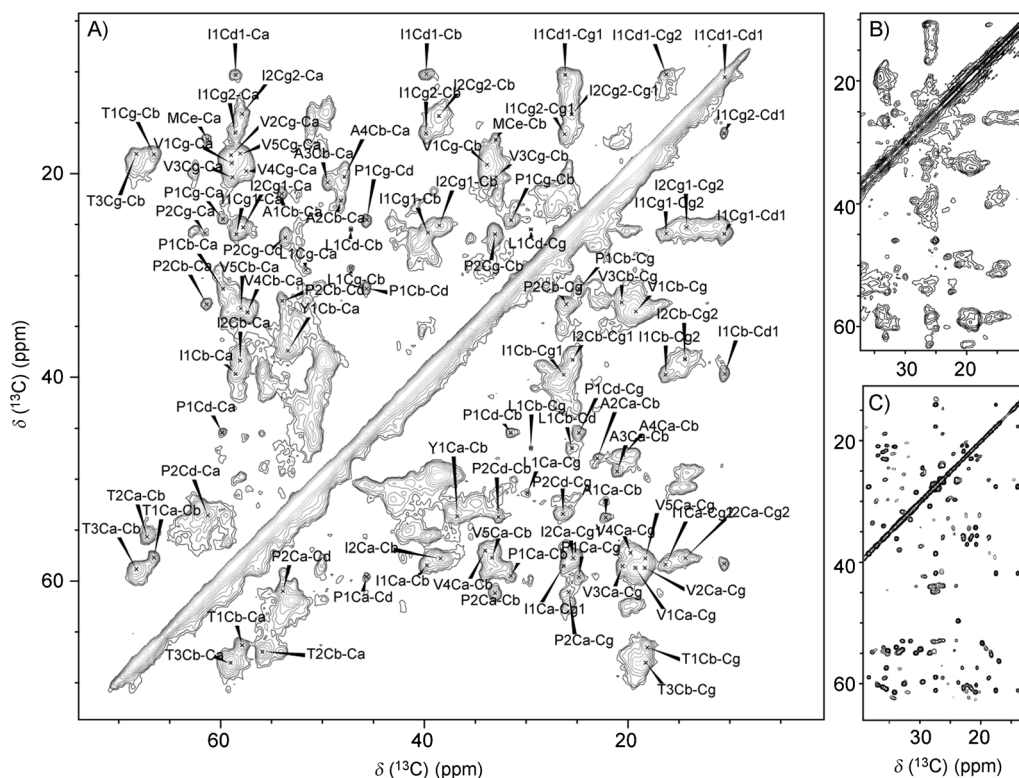


Abbildung 2. Die innere strukturelle Heterogenität von EAS_{15} -Stäbchen spiegelt sich in den ^{13}C -homonuklearen Korrelationen wider. A) $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Korrelationspektrum von EAS_{15} mit intraresidualen Korrelationen. Zu beachten ist, dass die Nummerierung lediglich verschiedene Spinsystemzugehörigkeit unterscheidet. B, C) Vergleich zwischen einer Stäbchen-Präparation des Hydrophobins EAS_{15} (B) und Prionenfibrillen von HET-s (218–289) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Beat Meier).^[4c] Siehe Abbildungen S2 und S3 für Spektren bei unterschiedlichen Mischzeiten sowie für einen Vergleich mit DewA, einem anderen stäbchenbildenden Hydrophobin.^[11]

zu den sehr gut definierten und klar aufgelösten Spektren geordneter Fibrillen. Letztere Gruppe umfasst Fibrillen von HET-s (218–289)^[4c] (mit ähnlicher Monomergröße wie EAS_{15} ; Abbildung 2C), Fibrillen eines 11 Aminosäuren langen amyloidogenen Peptids, das sich von Transthyretin ableitet,^[4a] und vom A β -Peptid (mit 40 Aminosäuren) gebildete Fibrillen.^[4d] Obwohl auch Fibrillen aus Proteinen höheren Molekulargewichts zu gut aufgelösten Spektren führen können,^[14] ist es merklich, dass die höherwertigen ssNMR-Spektren zumeist mit Amyloiden aus kürzeren Peptiden oder der isolierten amyloidogenen Region erhalten werden, während in den Stäbchen hier die gesamte funktionelle EAS_{15} -Proteineneinheit vorliegt. Die strukturelle Unordnung, die sich für EAS_{15} -Stäbchen auf der molekularen Ebene zeigt, steht im Gegensatz zu der scheinbaren Ordnung auf supramolekularer Ebene, wie sie sich durch gut gepackte und regelmäßige Morphologie in Kraft- und Elektronenmikroskopie für eine Serie von Substraten zeigt.^[2]

Trotz der starken Unordnung konnten aufgelöste Signalsätze von ca. 18 Aminosäureresten identifiziert werden, vor allem Ala, Ile, Thr, Val und Pro. Abbildung 2A zeigt Zuordnungen, die jeweils dem mithilfe von $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -homonuklearen (DARR-) Spektren und 3D-NCACX-Experimenten identifizierten Aminosäuretyp entsprechen. Die zwei Kreuzsignale mit chemischer Verschiebung von 50 ppm/15 ppm könnten von Ala-Resten mit hochfeldverschobenen C β -Signalen stammen oder, trotz ihrer Präsenz in PDSD-Spektren

mit kurzer Mischzeit (5 ms), sehr kurze interresiduale Kontakte widerspiegeln. Nicht aufgelöste Kreuzsignale in der Region um 35–40 ppm/50–55 ppm gehören wahrscheinlich zu Ca/C β -Kontakten von Cys-, Asp- und Asn-Resten.

Chemische Verschiebungen in den $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ -Spektren geben direkten Aufschluss über die zugrundeliegende Sekundärstruktur. Diese an ^1H -rückgetauschten, dreifach markierten EAS_{15} -Stäbchen aufgenommenen Korrelationen sind überwiegend tieffeldverschoben und weisen eine typische β -Faltblattverteilung auf. Für $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Korrelationen wurden sekundäre chemische Verschiebungen ($\Delta\alpha$ - $\Delta\beta$) errechnet und mit ihren Random-Coil-Pendants verglichen.^[15] Analog zu einem Chemical-Shift-Index deuten für einzelne Aminosäurereste extrahierte Ca- und C β -Werte in den meisten Fällen auf eine β -Faltblattkonformation hin (Abbildung 3). Obwohl fünf Val-C γ -Signale zugeordnet werden konnten, waren C β -Signale wenig aufgelöst; daher wurden in der Analyse der sekundären chemischen Verschiebungen nur zwei Val-Reste berücksichtigt. Für die drei anderen Val-Reste können allerdings ähnliche sekundäre chemische Verschiebungen und dementsprechend auch β -Faltblattkonformation angenommen werden.

Wie bei anderen Amyloidstrukturen weisen nicht-rest-spezifische spektroskopische Techniken wie CD-Spektropolarimetrie, Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie und Röntgen-Faserbeugung darauf hin, dass ein intermolekulares β -Faltblattmotiv EAS_{15} -Monomere innerhalb der Stäb-

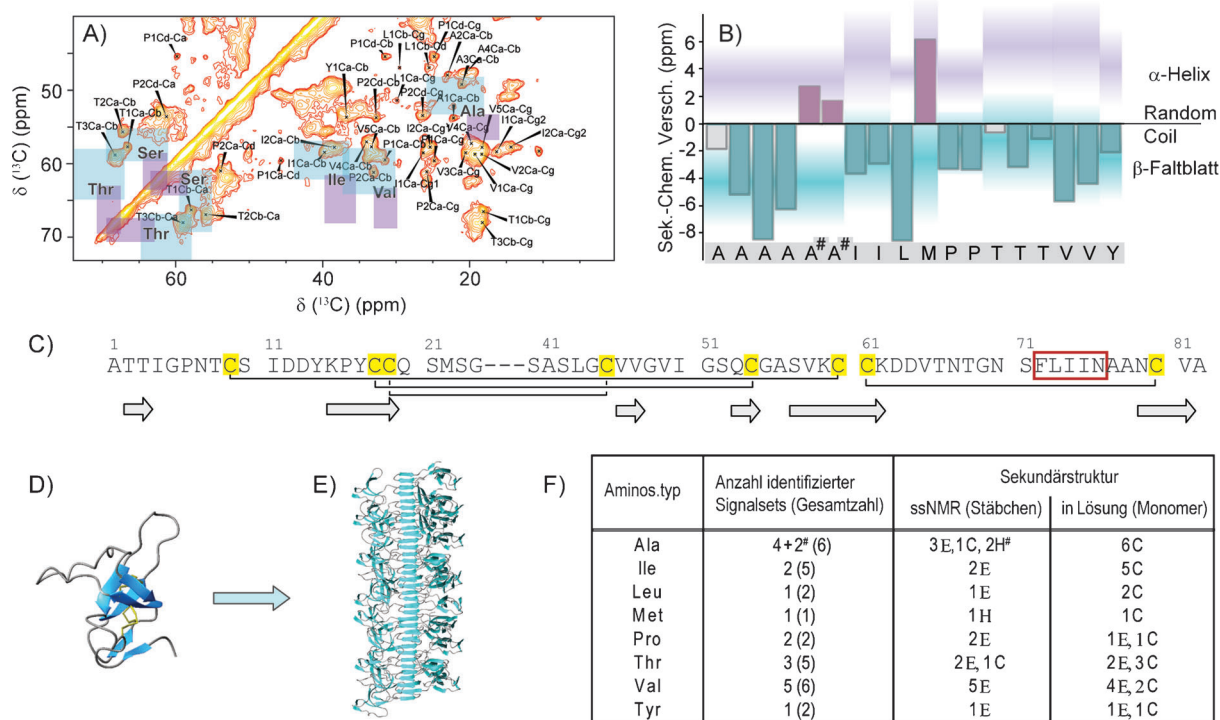


Abbildung 3. Sekundäre chemische Verschiebungen für dem Aminosäuretyp zugeordnete Reste in EAS_{Δ15}. A) Die meisten EAS_{Δ15}-chemischen Verschiebungen im ¹³C, ¹³C-Korrelationsspektrum fallen in β-Faltblattregionen (türkis), anstatt Random-Coil- oder α-helikale Verschiebungen (violett) aufzuweisen.^[16] Die farbigen Flächen stellen zwei Standardabweichungen (σ) vom Mittelwert der für die jeweilige Sekundärstruktur gültigen Verschiebungen dar. B) ΔCα–ΔCβ-Werte (bezeichnet als sekundäre chemische Verschiebung) der identifizierten Reste. Violette und türkise Flächen repräsentieren die Erwartungswerte ΔCα–ΔCβ für α-helikale bzw. β-Faltblattreste,^[16] wobei die intensivste Färbung den Mittelwert darstellt und die Flächen bei ±σ enden. Der zur sekundär-chemischen Verschiebung gehörende Balken eines jeden Aminosäurerestes ist violett, türkise oder grau, je nach Klassifizierung als α-helikale, β-Faltblatt- oder Random-Coil-Struktur. # kennzeichnet zwei Reste, die basierend auf Kreuzsignalen bei 50 ppm/15 ppm als Ala klassifiziert wurden. C) Aminosäuresequenz von EAS_{Δ15} mit Cys-Resten (gelb). Die Nummerierung entspricht den Resten in Vollängen-EAS. Die Sekundärstruktur von EAS_{Δ15} in Lösung ist darunter gegeben, wobei Pfeile β-Stränge andeuten. Zur amyloiden Sequenz gehörige Aminosäurereste (bezogen auf vorangehende Mutagenesestudien)^[17] sind rot umrahmt. D) Bänderdiagramm der EAS_{Δ15}-Lösungsstruktur. E) Darstellung des hypothetischen Stäbchenmodells mit von mehreren EAS_{Δ15}-Monomeren nach einfacher konformativer Änderung gebildeter Kreuz-β-Struktur.^[17] F) Aminosäurereste, die im Festkörper identifiziert wurden und ihre wahrscheinliche Sekundärstruktur (im Vergleich mit Erwartungswerten aus Lit. [16]), verglichen mit der Sekundärstruktur im Monomer. β-Faltblatt, α-Helix und Random Coil sind mit E, H bzw. C abgekürzt.

chenstruktur miteinander verbindet.^[18] Um intermolekulare β-Faltblätter zu bilden, müssen sich entweder vorher bestehende β-Stränge in der EAS_{Δ15}-Monomerstruktur mit denen eines benachbarten Monomers verbinden, oder eine strukturelle Reorganisation muss neue β-Stränge hervorbringen, die intermolekulare Wasserstoffbrücken bilden. Solche Strukturänderungen sind für eine Reihe anderer Amyloidfibrillen, wie die mit der Alzheimer-Krankheit assoziierten Aβ-Fibrillen, beobachtet worden.^[19] Die Region im EAS, für die die Bildung einer Kreuz-β-Struktur bei Stäbchenbildung postuliert wurde, wurde in der Primärsequenz lokalisiert.^[17] Unsere ssNMR-Daten erbringen direkte experimentelle Hinweise für substantielle Strukturänderungen im Monomer und die Bildung von neuen Sekundärstrukturelementen innerhalb der Stäbchen, was mit dem auf funktionellen Tests und Mutagenesedaten aufbauenden hypothetischen Modell^[18] konsistent ist. Zudem ist die in den ssNMR-Spektren beobachtete Unordnung mit dem angenommenen Modell zur Stäbchenbildung konsistent – wonach der Kreuz-β-Kern gut definiert ist, während die restliche Struktur eines jeden Monomers jeweils auf viele verschiedene Weisen un-

tergebracht werden kann, ohne die laterale Packung zwischen individuellen Stäbchen oder die allgemeine Amphipathie der Monolage zu beeinträchtigen.

Diese Studie legt ihren Fokus auf das vollständige funktionelle Amyloid anstatt nur auf den Kern der Fibrillen. Folglich ist es möglich, dass die strukturelle Heterogenität in den Regionen außerhalb des Kerns eine native, inhärente und sogar benötigte Eigenschaft der Stäbchenmonolagen ist. Es ist anzumerken, dass wir alle ¹⁵N/¹H- und ¹³C/¹³C-Korrelationen an EAS_{Δ15}-Stäbchen (und damit die Verteilung über das Ensemble) reproduzierbar über verschiedene Präparationen voranden (Abbildung S1A). Strukturelle Heterogenität könnte zusätzliche Funktionalität bieten, wie z. B. den Stäbchen zu erlauben, Monolagen mit enger lateraler Packung zu bilden (eine Eigenschaft, die in anderen Amyloidfibrillen nicht vorzufinden ist)^[17] oder Oberflächen mit unterschiedlicher Geometrie auf Nanometerebene zu versiegeln. Eine aktuelle Studie des funktionellen Amyloids Pmel17 hat ebenfalls aufgezeigt, dass konformative Variation um ein strukturelles Grundmotiv gleiche biologische Funktion hervorrufen kann.^[20]

Auch wenn die spektroskopische Charakterisierung für ganze funktionelle Proteine mit uneinheitlichem strukturellen Charakter wesentlich anspruchsvoller ist als für gekürzte Fragmente homogener Natur, bleiben die begrenzten Möglichkeiten, diese Systeme und ihre molekularen (Teil-)Strukturen zu definieren, erstrebenswert und können einzigartige Einblicke in biologische Funktionen gewähren. Wir haben hier gezeigt, dass sich Hydrophobinstäbchen zum großen Teil aus einer β -Faltblattstruktur mit einer im Vergleich zum Monomer in Lösung deutlich veränderten Faltung zusammensetzen. Der strukturell definierte β -Faltblattkern existiert inmitten einer Gesamtarchitektur, die strukturelle Heterogenität zeigt, aber kompatibel ist mit der Bildung von Stäbchen regelmäßiger Morphologie, die zu Monolagen assoziieren.

Eingegangen am 16. Juli 2012

Online veröffentlicht am 5. November 2012

Stichwörter: Amyloide · Faserproteine · Festkörper-NMR-Spektroskopie · Hydrophobine · Magic-Angle-Spinning

- [1] H. A. Wösten, M. L. de Vocht, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Biomembr.* **2000**, 1469, 79–86.
- [2] M. Sunde, A. H. Kwan, M. D. Templeton, R. E. Beever, J. P. Mackay, *Micron* **2008**, 39, 773–784.
- [3] A. H. Kwan, I. Macindoe, P. V. Vukasin, V. K. Morris, I. Kass, R. Gupta, A. E. Mark, M. D. Templeton, J. P. Mackay, M. Sunde, *J. Mol. Biol.* **2008**, 382, 708–720.
- [4] a) C. P. Jaroniec, C. E. MacPhee, V. S. Bajaj, M. T. McMahon, C. M. Dobson, R. G. Griffin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 711–716; b) A. K. Paravastu, R. D. Leapman, W. M. Yau, R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 18349–18354; c) C. Wasmer, A. Lange, H. v. Melckebeke, A. B. Siemer, R. Riek, B. H. Meier, *Science* **2008**, 319, 1523–1526; d) J.-M. Lopez del Amo, M. Schmidt, U. Fink, M. Dasari, M. Fändrich, B. Reif, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 6240–6243; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 6136–6139.
- [5] J. T. Nielsen, M. Bjerring, P. M. D. Jeppesen, R. O. Pedersen, J. M. Pedersen, K. L. Hein, T. Vosegaard, T. Skrydstrup, D. E. Otzen, N. C. Nielsen, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 2152–2155; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 2118–2121.
- [6] a) F. Castellani, B.-J. van Rossum, A. Diehl, M. Schubert, K. Rehbein, H. Oschkinat, *Nature* **2002**, 420, 98–102; b) M. J. Knight, A. L. Webber, A. J. Pell, P. Guerry, E. Barbet-Massin, I. Bertini, I. C. Felli, L. Gonnelli, R. Pierattelli, L. Emsley, T. Herrmann, G. Pintacuda, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 11901–11905; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 11697–11701.
- [7] R. Linser, M. Dasari, M. Hiller, V. Higman, U. Fink, J.-M. Lopez del Amo, S. Markovic, L. Handel, B. Kessler, P. Schmieder, D. Oesterheld, H. Oschkinat, B. Reif, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 4601–4605; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 4508–4512.
- [8] a) R. Linser, U. Fink, B. Reif, *J. Magn. Reson.* **2008**, 193, 89–93; b) R. Linser, B. Bardiaux, V. Higman, U. Fink, B. Reif, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 5905–5912; c) P. Schanda, B. H. Meier, M. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 15957–15967.
- [9] M. S. Dueholm, S. V. Petersen, M. Sonderkaer, P. Larsen, G. Christiansen, K. L. Hein, J. J. Enghild, J. L. Nielsen, K. L. Nielsen, P. H. Nielsen, D. E. Otzen, *Mol. Microbiol.* **2010**, 77, 1009–1020.
- [10] V. Chevelkov, Y. Xue, R. Linser, N. Skrynnikov, B. Reif, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 5015–5017.
- [11] M. A. Stringer, W. E. Timberlake, *Mol. Microbiol.* **1995**, 16, 33–44.
- [12] R. Linser, *J. Biomol. NMR* **2012**, 52, 151–158.
- [13] C. Wasmer, A. Schütz, A. Loquet, C. Buhtz, J. Greenwald, R. Riek, A. Böckmann, B. H. Meier, *J. Mol. Biol.* **2009**, 394, 119–127.
- [14] B. Habenstein, L. Bousset, Y. Sourigues, M. Kabani, A. Loquet, B. H. Meier, R. Melki, A. Böckmann, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 8087–8090; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 7963–7966.
- [15] D. S. Wishart, B. D. Sykes, *Meth. Enzymol.* **1994**, 239, 363–392.
- [16] Y. Wang, O. Jardetzky, *Protein Sci.* **2002**, 11, 852–861.
- [17] I. Macindoe, A. H. Kwan, Q. Ren, V. K. Morris, W. Yang, J. P. Mackay, M. Sunde, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, 109, E804–E811.
- [18] a) J. P. Mackay, J. M. Matthews, R. D. Winefield, L. G. Mackay, R. G. Haverkamp, M. D. Templeton, *Structure* **2001**, 9, 83–91; b) A. H. Y. Kwan, R. D. Winefield, M. Sunde, J. M. Matthews, R. G. Haverkamp, M. D. Templeton, J. P. Mackay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 3621–3626.
- [19] a) M. Dasari, A. Espargaro, R. Sabate, J.-M. Lopez del Amo, U. Fink, G. Grelle, J. Bieschke, S. Ventura, B. Reif, *ChemBioChem* **2011**, 12, 407–423; b) I. Bertini, L. Gonnelli, C. Luchinat, J. Mao, A. Nesi, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 16013–16022.
- [20] K. N. Hu, R. P. McGlinchey, R. B. Wickner, R. Tycko, *Biophys. J.* **2011**, 101, 2242–2250.