

Die Konformation der Prionendomäne von Sup35: isoliert und im Kontext des Volllängen-Proteins^{**}

Nina Luckgei, Anne K. Schütz, Luc Bousset, Birgit Habenstein, Yannick Sourigues, Carole Gardiennet, Beat H. Meier,* Ronald Melki* und Anja Böckmann*

Das Sup35p-Hefeprotein zeigt Prioneneigenschaften^[1] und bildet fibrilläre Aggregate.^[2] Es ist der Auslöser des [PSI⁺]-Phänotyps in der Bäckerhefe, *Saccharomyces cerevisiae*.^[3] Das Sup35p-Hefepron ist ein wichtiges Modellsystem zur Untersuchung der Struktur-Funktions-Beziehung von Prionen. Um den Schwierigkeitsgrad der Untersuchungen zu verringern, wird das Sup35pNM-Fragment häufig stellvertretend als Modell zur Beschreibung des Aufbaus und der infektiösen Eigenschaften des Volllängen-Prions verwendet, da fibrilläres Sup35pNM biologisch relevant ist in dem Sinne, dass es [PSI⁺] induziert, wenn es in [psi⁻]-Zellen eingeführt wird.^[4] Die Annahme, dass fibrilläres Sup35pNM das Verhalten von Sup35p-Fibrillen gänzlich imitiert, setzt voraus, dass die N- und M-Domänen von Sup35p identische Konformationen in Sup35pNM- und Sup35p-Fibrillen zeigen.^[5] Wir hinterfragen diese Annahme im Folgenden: Mithilfe von Festkörper-NMR-Messungen am Sup35pNM Fragment und an Volllängen-Sup35p-Fibrillen, welche unter identischen physiologischen Bedingungen fibrillisiert wurden und beide [PSI⁺] induzieren (wie in Abbildung S1 gezeigt), legen wir dar, dass die Sup35pNM- und Volllängen-Sup35p-Fibrillen deutlich unterschiedliche Strukturen aufweisen, obgleich beide einen hohen β -Faltblatt-Anteil zeigen.

Sup35p ist ein Drei-Domänen-Polypeptid (Tabelle S1); die N-terminale Domäne ist für die Prionen-Ausbreitung verantwortlich, während die C-terminale Domäne GTPase-

Aktivität zeigt und an der Translationsbeendigung beteiligt ist.^[6] Die mittlere Domäne (M) verbindet die beiden Domänen. Die N-Domäne alleine, zusammen mit der M-Domäne oder als Teil von Volllängen-Sup35p, bildet Amyloid-Fibrillen.^[5a,b,7] Fibrillen sowohl von Sup35p als auch von Sup35pNM ermöglichen die Aufnahme hochaufgelöster Festkörper-NMR-Spektren, wie zum Beispiel der 2D-Spektren in Abbildung 1 a und 1 b für Sup35pNM und Sup35p (die

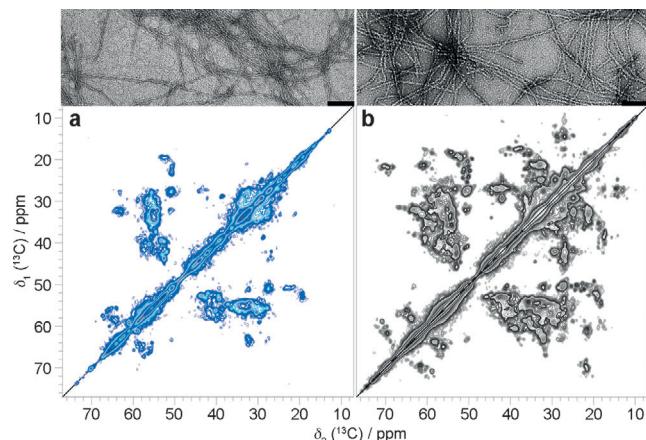


Abbildung 1. ^{13}C - ^{13}C -Korrelationsspektren (DARR) von fibrillärem Sup35pNM (a) und Sup35p (b), aufgenommen mit einer Mischzeit von 20 ms. Alle Spektren wurden bei einem Magnetfeld von 20 T und einer MAS-Frequenz von 17.5 kHz aufgezeichnet. Negativ gefärbte elektronenmikroskopische Aufnahmen von Sup35pNM- und Sup35p-Fibrillen sind oberhalb der entsprechenden Spektren gezeigt (Maßstab 0.2 μm).

[*] N. Luckgei,^[+] Dr. B. Habenstein,^[+] Dr. C. Gardiennet, Dr. A. Böckmann
Institut de Biologie et Chimie des Protéines
UMR 5086 CNRS/Université de Lyon 1
7 passage du Vercors, 69367 Lyon (Frankreich)
E-Mail: a.bockmann@ibcp.fr

Dr. A. K. Schütz,^[+] Prof. Dr. B. H. Meier
Physical Chemistry, ETH Zürich
Wolfgang-Pauli-Strasse 10, 8093 Zürich (Schweiz)
E-Mail: beme@ethz.ch

Dr. L. Bousset,^[+] Y. Sourigues, Dr. R. Melki
Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurale, UPR 3082
CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette (Frankreich)
E-Mail: Ronald.Melki@lebs.cnrs-gif.fr

[+] N.L., A.K.S., L.B. und B.H. haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

[**] Wir danken Dr. Christian Wasmer für die Hilfe bei der Aufnahme der Spektren. Diese Arbeit wurde von der ANR (ANR-12-BS08-0013-01), der ETH Zürich, dem SNF (Stipendien 200020_134681, 200020_146757) und dem CNRS unterstützt. Wir danken für die Unterstützung durch die Europäische Kommission unter dem Siebten Rahmenprogramm (RP7), Vertrag Bio-NMR 261863.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201304699> zu finden.

Spektren sind überlagert in Abbildung S2). Ebenfalls in Abbildung 1 finden sich die zugehörigen elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Die schmalen und gut aufgelösten NMR-Resonanzlinien deuten auf das Vorhandensein von hoch geordneten Strukturen in beiden Fibrillen hin. Um die spektrale Auflösung zu erhöhen, haben wir 3D-NCACB-Spektren aufgenommen, in denen jeder Aminosäurerest durch eine ($\text{N}, \text{C}_\alpha, \text{C}_\beta$)-Frequenztriade charakterisiert ist. Während man 253 und 685 Signale für Sup35pNM bzw. Sup35p erwarten würde, ist die Zahl der starken Signale in den 3D-Spektren überraschenderweise nur 35 bzw. 25 (Abbildung 2 a für eine repräsentative Ebene). Die Kombination mehrerer 3D-Experimente^[8] hat uns die Resonanzzuordnung der Spin-Systeme ermöglicht, und die entsprechenden chemischen Verschiebungen für je 22 Aminosäurereste von Sup35p und Sup35pNM sind in der BMRB hinterlegt (Zu-

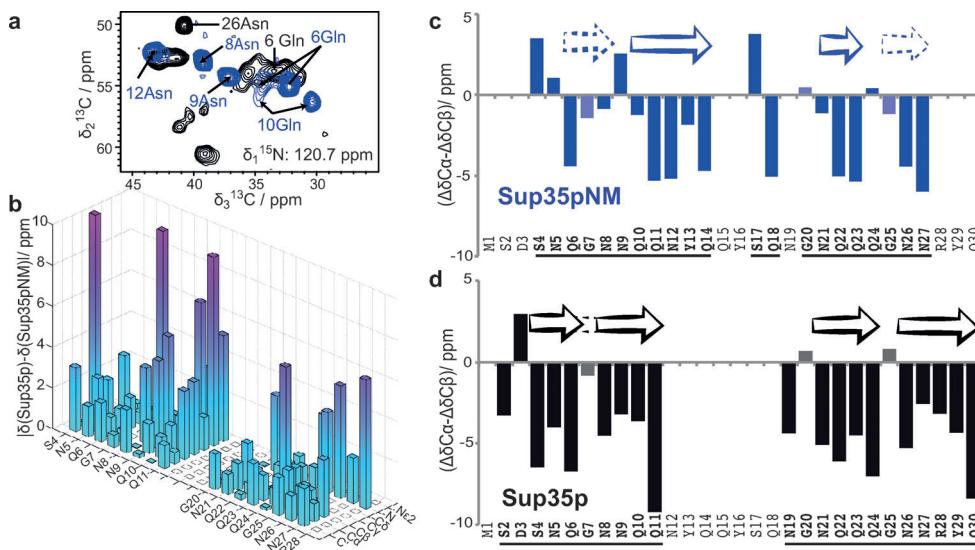


Abbildung 2. a) Überlagerung zweier repräsentativer Ebenen der 3D-NCACB-Spektren von Sup35pNM (blau) und Sup35p (schwarz). Sequenzielle Signalzuordnungen sind angegeben. Experimentelle Details sind in Tabelle S3 gegeben. b) Vergleich der chemischen Verschiebungen von Sup35pNM und Sup35p. Der absolute Wert der Differenz der chemischen Verschiebungen für alle ^{13}C - und ^{15}N -Kerne, die in beiden Proteinen zugeordnet sind, ist aufgetragen. c,d) Vergleich der sekundären chemischen Verschiebungen^[11] für Sup35pNM (c) und Sup35p (d). Helle Farben beziehen sich auf $\Delta\delta\text{C}\alpha$ von Glycin. Durchgezogene Pfeile bezeichnen β -Faltblätter, gestrichelte Pfeile mögliche Erweiterungen davon, Gly-Aminosäurereste einschließlich.

gangskennzahlen 18407 und 18406).^[9] Alle zugeordneten Aminosäurereste befinden sich in den 30 N-terminalen Aminosäureresten von Sup35p und Sup35pNM. Wir bezeichnen diese Region im Folgenden als Kern-Amyloid-Region (ein von Weissman vorgeschlagener Begriff^[4]). Signale für siebzehn der 22 zugeordneten Aminosäurereste können in den Spektren beider Proteine beobachtet und somit bezüglich ihrer chemischen Verschiebungen verglichen werden (Abbildung 2b). Es ist bekannt, dass die ^{13}C -chemische Verschiebung von der lokalen Konformation abhängt und dass die chemischen Verschiebungen der Rückgratkohlenstoffatome (und auch des C_β) stark mit den Diederwinkeln ϕ und ψ korrelieren.^[10] Wir beobachten Unterschiede in den chemischen Verschiebungen zwischen Sup35p und Sup35pNM von über 10 ppm, was für einige dieser Kerne fast dem gesamten Bereich der kanonischen chemischen Verschiebung entspricht. Somit muss die Konformation der Mehrheit der zugeordneten Aminosäurereste deutlich unterschiedlich sein zwischen Sup35pNM und Sup35p. Darüber hinaus entsprechen die chemischen Verschiebungen, die wir beobachteten, nicht denen von Fibrillen und Kristallpolymeren des Peptids GNNQQNY, das aus den Aminosäureresten 7 bis 13 von Sup35p besteht (siehe Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen).

Die sekundären chemischen Verschiebungen (Abbildung 2c,d) sind ein guter Indikator für die Sekundärstruktur eines Proteins^[11] und weisen hier, für die Aminosäurereste 2–30, eindeutig auf einen hohen β -Faltblatt-Anteil. Jedoch ist die Verteilung der β -Faltblätter in den beiden Proteinen klar unterschiedlich. Die β -Faltblätter sind durch Pfeile markiert, gestrichelte Pfeile markieren vermutete β -Faltblätter mit Gly-Aminosäureresten, die in den wenigen vorhandenen Fibril-

lenstrukturen nicht Teil der β -Faltblätter waren, sondern in Biegungen lagen.^[12]

Die meisten Aminosäurereste in Sup35p und Sup35pNM ergeben keine sichtbaren Korrelationssignale in den 3D-Festkörper-NMR-Spektren, was entweder durch dynamische oder statische Unordnung erklärt wird. In INEPT-Spektren^[13] konnten wir entsprechende Signale für die meisten Aminosäurerestarten erkennen. Diese Spektren sehen für Sup35p und Sup35pNM ähnlich aus.^[9] Resonanzen von Aminosäureresten mit Dynamik können auch selektiv in direkt gepulsten ^{13}C -2D-Korrelationsspektren, die mit einer kurzen Relaxationswartedauer aufgezeichnet wurden, erkannt werden. Ein Ausschnitt aus einem solchen Spektrum ist für Sup35pNM

in Abbildung 3a in blau gezeigt (für die volle aliphatische Region siehe Abbildung S4). Das Spektrum wird deutlich von Signalen bei den typischen chemischen Verschiebungen für Aminosäurereste in wahllosen Windungen („random coil“) dominiert.^[14] Die chemischen Verschiebungen eines bestimmten Aminosäurerests überlappen, mit Ausnahme der Aminosäurereste, die direkt vor einem Prolin angeordnet sind und die deutlich verschoben sind. Wir finden klare Hinweise darauf, dass sich die überwiegende Mehrheit dieser flexiblen Aminosäurereste innerhalb der M-Domäne befindet: 1) alle Aminosäurerestarten, die sich in der M-Domäne befinden, zeigen Signale im Spektrum, und Aminosäurereste, die nur innerhalb den Sup35p N- und C-terminalen Domänen vorkommen, fehlen in den Spektren; 2) wir beobachten Ala-Pro- und Lys-Pro-Paare, die nur in der M-Domäne vorkommen; 3) die Signalintensitäten korrelieren gut mit der Häufigkeit des Auftreten von Aminosäureresten in der M-Domäne, sowohl in Sup35pNM als auch in Sup35p (Abbildung 3e,f); 4) Thr-Signale werden in diesen Spektren beobachtet, während sie in Kreuzpolarisations(CP)-basierten 2D-DARR-Spektren mit kurzen Mischzeiten (Abbildung S5) nicht beobachtbar sind. In der Tat befinden sich in Sup35pNM alle 11 Thr-Aminosäurereste in der M-Domäne. Der Polarisationsaufbau des Thr-Signals unter CP ist langsam (Abbildung 3c), was das flexible Verhalten der M-Domäne unterstreicht. Signale, die einem Ala-Pro-Paar oder Thr-Aminosäureresten in wahllosen Windungen entsprechen, können auch in Sup35p-Spektren beobachtet werden; Überlagerung mit Signalen von der C-terminalen Domäne behindern allerdings eine ähnliche Analyse des Verhaltens dieser Signale. Eine Analyse der Signalintensitäten für Sup35pNM (3f) legt aber nahe, dass die M-Domäne ebenfalls der Ursprung dieser

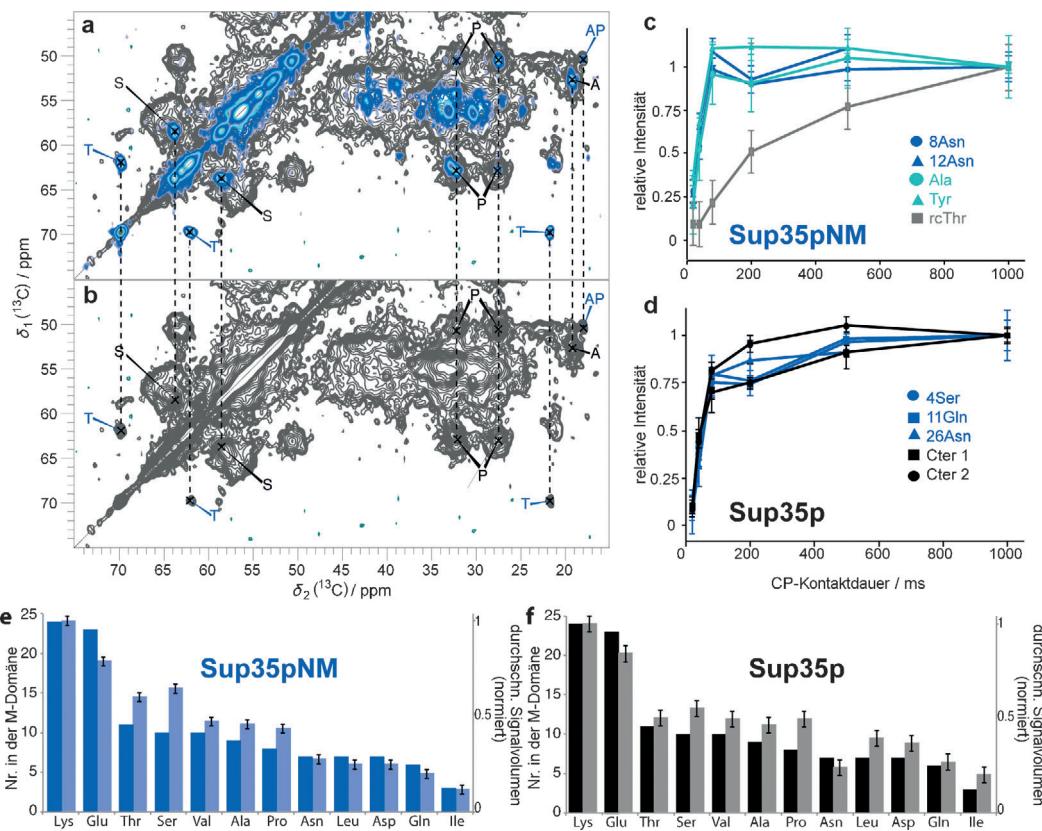


Abbildung 3. a) Überlagerung eines 100-ms-DARR-Spektrums für Sup35pNM (grau) mit einem direkt gepulsten 100-ms-DARR-Spektrum (blau) mit einem ^{13}C - T_1 -Filter (mit einer kurzen Relaxationszeit von 4 s). Isolierte Signale von Aminosäureresten aus N- und M-Domänen sind in schwarz, mit denjenigen, die nur in der M-Domäne erscheinen, in blau beschriftet. b) nur das 100-ms-DARR-Spektrum. c,d) CP-Aufbaudynamik für ausgewählte Aminosäureresten (von C_α - C_β -Kreuzsignalen). Aminosäurereste aus der Kern-Amyloid-Region sind dunkelblau, Aminosäurereste aus der verbleibenden N-Domäne hellblau, aus der M-Domäne grau und der C-Domäne schwarz kodiert. e,f) Vergleich der C_α - C_β -Kreuzsignalvolumina aus den direkt gepulsten PDSD-Spektren (Abbildung S3) mit der Aminosäureverteilung in der M-Domäne, auf die Intensität der Lys-Aminosäurereste normiert. Der Fehler ist die Standardabweichung des Rauschens in direkt gepulsten PDSD-Spektren.

Signale in Sup35p ist. Somit ist die M-Domäne flexibel und nimmt eine Konformation in wahllosen Windungen in Sup35pNM und auch Sup35p ein, was das Fehlen der entsprechenden Signale in den 3D-Spektren erklärt.

Tyr-Resonanzen sind besonders gut geeignet, um die verbleibende N-Domäne (der Teil, der nicht mit 3D-Spektroskopie beobachtet werden konnte) zu charakterisieren, da sie nur in diesem Abschnitt des Proteins vorkommen. In 2D-Experimenten führen diese Resonanzen zu konturlosen Korrelationen über den gesamten Bereich von β -Faltblatt-typischen chemischen Verschiebungen (Abbildung S6). Wir schließen einen signifikanten dynamischen Beitrag zur Liniendicke aus, da die Relaxationszeiten T_2 der C_α -Resonanzen lang sind (Tabelle S2) und der CP-Aufbau schnell ist (Abbildung 3c). Wir folgern, dass sich die Tyr-Reste vor allem in β -Faltblatt-Konformation befinden, in Übereinstimmung mit früheren Befunden,^[15] sich aber, im Unterschied zu den Kern-Amyloid-Aminosäureresten, in einer statisch ungeordneten Umgebung befinden. Neben Tyr-Aminosäureresten finden sich in den 2D-DARR-Spektren von Sup35pNM zusätzliche breite Resonanzen (Abbildung 3a), die Pro-, Ser- und Ala-Aminosäureresten zugeordnet werden können. Die chemi-

schen Verschiebungen der Ala-Aminosäurereste decken das gesamte Spektrum von typischen Resonanzpositionen für α -Helix/Windungen und β -Faltblatt ab. Ihr dynamisches Verhalten (Tabelle S1 und Abbildung 3c) ist ähnlich dem der Tyr-Aminosäurereste. Wir vermuten daher, dass sich diese Aminosäurereste ebenfalls in der verbleibenden N-Domäne befinden. Für das Volllängen-Protein ist die eindeutige Zuordnung der einzelnen Signale der verbleibenden N-Domäne schwieriger. Nichtsdestotrotz sind die Spektren mit der Annahme vereinbar, dass die Teile der N-Domäne, die nicht Teil der Kern-Amyloid-Region sind, statisch ungeordnet sind in dem Sinne, dass die Konformation jedes Aminosäurerests in diesem Teil variabel ist. Dennoch sind

diese Aminosäurereste in β -Faltblättern organisiert. Ob die Unordnung innerhalb jeder Fibrille vorliegt, wie wir vermuten, oder zwischen Fibrillen in einer Weise, die als umfangreicher Polymorphismus in diesem Teil des Proteins beschrieben werden könnte, kann durch eine Ensemblemessung wie sie der NMR-Spektroskopie zugrunde liegt, nicht bestimmt werden.

Die Mehrheit der Sup35p-Aminosäurereste gehört zur C-terminalen Domäne, die in den Fibrillen biochemisch funktionell bleibt,^[5b] was darauf hindeutet, dass sie ihre Struktur beibehält. Wir haben ein Homologiemodell ausgehend von der Röntgenstruktur des homologen Protein aus *S. pombe*^[16] erstellt, und die mit dem Programm Sparta^[17] vorhergesagten chemischen Verschiebungen zeigen eine ähnliche Ausbreitung und Verteilung von Signalen (Abbildung S7). Die aufgelösten Signale, die keine Entsprechung in den Sup35pNM-Spektren haben, können zunächst der C-terminalen Domäne zugeordnet werden. Wir fanden schmale Liniendichten und viele gut aufgelöste Signale, was bestätigt, dass die C-terminalen Domäne geordnet und gut strukturiert ist. Wie in Abbildung 3d (schwarz) gezeigt wird, ist die Aufbaugeschwindigkeitskonstante der CP-Signale aus der C-terminalen

Domäne sehr ähnlich derjenigen der Signale aus der Kern-Amyloid-Region, was anzeigt, dass keine Dynamik großer Amplitude stattfindet. Dennoch können diese Aminosäurereste nicht in den 3D-Spektren beobachtet werden, was anzeigt, dass subtile dynamische Effekte, vermutlich eine noch nicht vollständig charakterisierte Gesamtbewegung der globulären Domäne, die Ursache der Signalabschwächung in den 3D-Spektren ist.

Unsere Studie gibt einen Einblick in die Struktur und die Dynamik der N-, M- und C-Domänen von Sup35p in Fibrillen und zeigt, dass die verschiedenen Domänen ein unterschiedliches Verhalten aufweisen. Die geordnete Kern-Amyloid-Region der Fibrillen befindet sich innerhalb der ersten dreißig Aminosäurereste und zeigt β -Faltblatt-Sekundärstruktur, in Übereinstimmung mit dem langsamen H-D-Austausch, der für Aminosäurereste 4–37 in Sup35pNM-Fibrillen beobachtet wurde, die bei 4°C gebildet wurden.^[4] Der schnellere H-D-Austausch, der für die verbleibenden Aminosäurereste von Sup35pNM beobachtet wurde,^[4] stimmt mit dem Fehlen einer regelmäßigen, geordneten Sekundärstruktur überein, obwohl die Beobachtung von Toyama et al.^[4] von moderatem Schutz für einige weitere Aminosäurereste auch die zusätzliche Bildung von stabilen Wasserstoffbrücken in diesem Teil des Proteins andeuten kann. Der ungeordnete, aber statischen Charakter eines signifikanten Anteils der Aminosäurereste in Sup35pNM lässt vermuten, dass unspezifische Wechselwirkungen zwischen aromatischen Aminosäureresten außerhalb der Kern-Amyloid-Region eine wichtige Rolle bei den ersten Schritten der Aggregation spielen könnten.^[18] Eventuell könnte diese möglicherweise polymorphe Region das Entstehen verschiedener Stämme in Sup35p erklären, da, während die Kern-Amyloid-Region deutlich eine definierte Struktur zeigt, diese immobilisierten Segmente der N-Domäne unterschiedliche Konformationen in verschiedenen Stämmen haben könnte.

Unsere Erkenntnisse werfen ein neues Licht auf die überraschend Vielfalt der Prionen-Aggregate, für die Konformationsänderungen eine verblüffende und manchmal verwirrende Rolle spielen. Sie stützen das sich entwickelnde Bild, dass Prionen komplexe Struktureinheiten sind. Denn selbst wenn eine bestimmte Domäne eine sehr definierte Struktur zeigt, kann sie verschiedene Konformationen annehmen in Abhängigkeit von den Umständen (isoliert, in Zusammenhang mit einem größeren Fragment oder im Vollängen-Protein) oder der Umgebung (Pufferbedingungen, Chaperone). Für funktionelle Prionen, wie das HET-s/HET-S-System, können diese Eigenschaften zu einem funktionellen Schalter werden, der Apoptose auslöst.^[19] Unsere Ergebnisse geben einen Erklärung auf molekularer Ebene für die kontrastierende Aggregationsneigung und Infektiosität von Sup35pNM und Sup35p und betonen die überragende Bedeutung einer strukturellen Charakterisierung der Aggregate, die in funktionellen Studien untersucht werden.

Experimentelles

Die Expression und Reinigung der Proteine wurde wie früher beschrieben durchgeführt, unter Benutzung von M9-Medium mit ¹⁵N- und ¹³C-Isotopen.^[5a,b] Sup35p wurde in Pufferlösung (20 mM Tris HCl,

pH 8.0, 200 mM NaCl, 5% Glycerin, 5 mM β -Mercaptoethanol, 10 mM MgCl₂) bei 10°C für 3 Wochen unter kreisendem Schütteln inkubiert (30 Upm, 0.5 cm Amplitude). Die Fibrillen wurden mit 100 000 g in einer TL-100-Tischzentrifuge für 20 Minuten zentrifugiert, bei 4°C. Die Pellets wurden in destilliertem Wasser, zweimal gewaschen und durch Ultrazentrifugation in 3.2-mm-Rotoren gefüllt.^[20] Alle Spektren wurden auf einem Bruker Avance II + Spektrometer (850 MHz) aufgezeichnet bei einem statischen Feld von 20 T. Dazu wurde ein mit einer LLC-Spule ausgestatteter Bruker-Tripleresonanz-MAS-Messkopf (3.2 mm) verwendet. Die Probentemperatur betrug etwa 7°C. Die Pulssequenzen wurden wie kürzlich berichtet implementiert,^[8a] und die experimentellen Parameter sind in Tabelle S3 gegeben. Alle Spektren wurden unter Verwendung von TopSpin 2.0 (Bruker BioSpin) mit Null-Füllung und Apodisierung mit einer Cosinus-Quadrat-Funktion verarbeitet und mit dem CCPNMR Analysis Programm analysiert und annotiert.^[21]

Eingegangen am 31. Mai 2013,
veränderte Fassung am 24. Juli 2013
Online veröffentlicht am 9. Oktober 2013

Stichwörter: Festkörper-NMR-Spektroskopie · Fibrillen · Prionen · Proteine · Sup35p

- [1] R. B. Wickner, *Science* **1994**, *264*, 566.
- [2] J. R. Glover, A. S. Kowal, E. C. Schirmer, M. M. Patino, J. J. Liu, S. Lindquist, *Cell* **1997**, *89*, 811.
- [3] B. S. Cox, *Heredity* **1965**, *20*, 505.
- [4] B. Toyama, M. Kelly, J. Gross, J. Weissman, *Nature* **2007**, *449*, 233.
- [5] a) J. Krzewska, R. Melki, *EMBO J.* **2006**, *25*, 822; b) J. Krzewska, M. Tanaka, S. G. Burston, R. Melki, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 1679; c) M. Kabani, B. Cosnier, L. Bousset, J.-P. Rousset, R. Melki, C. Fabret, *Mol. Microbiol.* **2011**, *81*, 640.
- [6] a) G. Zhouravleva, L. Frolova, X. Legoff, R. Leguellec, S. Ingvechtomov, L. Kisselev, M. Philippe, *EMBO J.* **1995**, *14*, 4065; b) I. Stansfield, K. Jones, V. Kushnirov, A. Dagkesamanskaya, A. Poznyakovski, S. Paushkin, C. Nierras, B. Cox, M. Teravanesyan, M. Tuite, *EMBO J.* **1995**, *14*, 4365.
- [7] a) C. King, R. Diaz-Avalos, *Nature* **2004**, *428*, 319; b) M. Tanaka, P. Chien, N. Naber, R. Cooke, J. Weissman, *Nature* **2004**, *428*, 323; c) F. Shewmaker, D. Kryndushkin, B. Chen, R. Tycko, R. B. Wickner, *Biochemistry* **2009**, *48*, 5074.
- [8] a) A. Schuetz, C. Wasmer, B. Habenstein, R. Verel, J. Greenwald, R. Riek, A. Böckmann, B. H. Meier, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1543; b) B. Habenstein, C. Wasmer, L. Bousset, Y. Sourigues, A. Schütz, A. Loquet, B. H. Meier, R. Melki, A. Böckmann, *J. Biomol. NMR* **2011**, *51*, 235.
- [9] a) A. Schütz, B. Habenstein, N. Luckgei, L. Bousset, Y. Sourigues, A. B. Nielsen, R. Melki, A. Böckmann, B. H. Meier, *Biomol. NMR Assignments* **2013**, DOI: 10.1007/s12104-013-9515-1; b) N. Luckgei, A. Schütz, B. Habenstein, L. Bousset, Y. Sourigues, R. Melki, B. H. Meier, A. Böckmann, *Biomol. NMR Assignments* **2013**, DOI: 10.1007/s12104-013-9518-y.
- [10] D. S. Wishart, B. D. Sykes, F. M. Richards, *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 311.
- [11] Y. Wang, O. Jardetzky, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 852.
- [12] a) H. van Melckebeke, C. Wasmer, A. Lange, E. Ab, A. Loquet, A. Böckmann, B. H. Meier, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13765; b) C. Wasmer, A. Lange, H. van Melckebeke, A. B. Siemer, R. Riek, B. H. Meier, *Science* **2008**, *319*, 1523.
- [13] A. Siemer, A. Arnold, C. Ritter, T. Westfeld, M. Ernst, R. Riek, B. H. Meier, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13224.
- [14] K. Tamiola, B. Acar, F. A. A. Mulder, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 18000.

- [15] F. Shewmaker, R. B. Wickner, R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 19754.
- [16] C. Kong, K. Ito, M. A. Walsh, M. Wada, Y. Liu, S. Kumar, D. Barford, Y. Nakamura, H. Song, *Mol. Cell* **2004**, *14*, 233.
- [17] Y. Shen, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **2007**, *38*, 289.
- [18] Y. Ohhashi, K. Ito, B. H. Toyama, J. S. Weissman, M. Tanaka, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 225.
- [19] C. Seuring, J. Greenwald, C. Wasmer, R. Wepf, S. J. Saupe, B. H. Meier, R. Riek, *PLoS Biol.* **2012**, *10*, e1001451.
- [20] A. Böckmann, C. Gardiennet, R. Verel, A. Hunkeler, A. Loquet, G. Pintacuda, L. Emsley, B. H. Meier, A. Lesage, *J. Biomol. NMR* **2009**, *45*, 319.
- [21] a) W. Vranken, W. Boucher, T. Stevens, R. Fogh, A. Pajon, P. Llinas, E. Ulrich, J. Markley, J. Ionides, E. Laue, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2005**, *59*, 687; b) T. J. Stevens, R. H. Fogh, W. Boucher, V. A. Higman, F. Eisenmenger, B. Bardiaux, B.-J. van Rossum, H. Oschkinat, E. D. Laue, *J. Biomol. NMR* **2011**, *51*, 437.