

Spurlose Aufreinigung und Desulfurierung von Ligationsprodukten des Tau-Proteins**

Oliver Reimann, Caroline Smet-Nocca und Christian P. R. Hackenberger*

Abstract: Wir präsentieren eine neue Strategie zur spurlosen Aufreinigung und synthetischen Modifikation von durch native chemische Ligation erzeugten Peptiden und Proteinen. Die Strategie umfasst die Immobilisierung eines photospaltbaren semisynthetischen Biotin-Protein-Konjugats an Streptavidin-Agarosepartikel, wodurch aufwendiges Umpuffern vermieden und überschüssiges Peptid und Additive entfernt werden können. Eine Desulfurierung der immobilisierten Peptide und Proteine liefert nach Abspaltung die gewünschten Tag-freien Produkte. Mit dieser Methode konnte Alzheimer-relevantes Tau-Protein aus einer komplexen EPL-Mischung und dreifach phosphoryliertes C-terminales Tau-Peptid isoliert werden.

Die Methoden der nativen chemischen Ligation (NCL) und der Ligation an exprimierte Proteine (EPL; expressed protein ligation) haben den Zugang zu Proteinen mit posttranslationalen Modifikationen revolutioniert.^[1] Beide Ligationsen sind chemoselektiv und beginnen mit der Reaktion zwischen einem N-terminalen Cystein eines Peptids und einem C-terminalen Thioester eines anderen Peptids, gefolgt von einer intramolekularen Umlagerung unter Bildung einer Amidbindung. Da mindestens eines der beiden Fragmente synthetisch generiert werden kann, können so posttranskriptionale Modifikationen oder andere funktionale Markierungen eingeführt werden. NCL und EPL ebneten den Weg zu einem tiefgreifenden Verständnis von Proteinfunktionen,^[2] zum Protein-Design,^[3] zur Bestimmung komplexer Proteinstrukturen durch NMR,^[4] und Röntgenspektroskopie,^[5] und sie ermöglichen Einblicke in die Rolle posttranskriptionaler Modifikationen in komplexen biologischen Prozessen.^[6] Trotz dieser Erfolge können die Durchführungs- und Aufreinigungs-

schritte von NCL- und EPL-Reaktionen zeitraubend und unergiebig sein, besonders wenn nach der Ligation noch weitere chemische Schritte mit wechselnden Reaktionsbedingungen folgen, etwa eine Desulfurierung, um ein Cystein durch ein Alanin an der Ligationsstelle zu ersetzen. Nicht-native Thiole können entweder durch heterogene reduktive^[7] oder homogene radikalische^[8] Bedingungen desulfuriert werden. Insbesondere homogene radikalische Desulfurierungen finden häufig Anwendung in der Proteinsynthese aufgrund der milden Reaktionsbedingungen und guten Ausbeuten, die jedoch bei Nutzung von Übergangsmetallen durch Adsorption drastisch sinken. Allerdings werden bei der Desulfurierung ein Pufferaustausch und eine intermediaire HPLC-Aufreinigung benötigt. Obwohl eine Eintopf-Ligation/Desulfurierung in Anwesenheit von überschüssigen Alkylthiolen wie 2-Mercaptoethansulfonat (MESNa) oder Glutathion möglich ist, versagt dieses Protokoll bei stark aktivierenden Arylthiolen wie Thiophenol oder 4-Mercapto-phenylsäure (MPAA), da diese als Radikalfänger fungieren und mit der Desulfurierung konkurrieren.^[9] So wurden einige Methoden entwickelt, um Arylthiole aus Ligationsmischungen zu entfernen, sodass eine Eintopf-Ligation/Desulfurierung ermöglicht wird. Beispiele sind die Flüssig/flüssig-Extraktion von überschüssigem Thiophenol mit Diethylether und Festphasenextraktionen.^[10] In diesem Zusammenhang setzten Brik et al. einen difunktionellen Arylthiol-Katalysator ein, der mithilfe eines Aldehyd-Harzes entfernt werden konnte.^[11] In einem anderen Verfahren verwendeten Payne et al. stark aktivierendes Trifluorethanethiol (TFET) als Additiv, das nicht mit der Desulfurierung konkurriert.^[12] Eine neuere Methode ist die sukzessive Anwendung von NCL und Desulfurierung an fester Phase, bei der nach Behandlung mit Trifluoressigsäure (TFA) Cystein-freies Ligationsprodukt erzeugt wird.^[13]

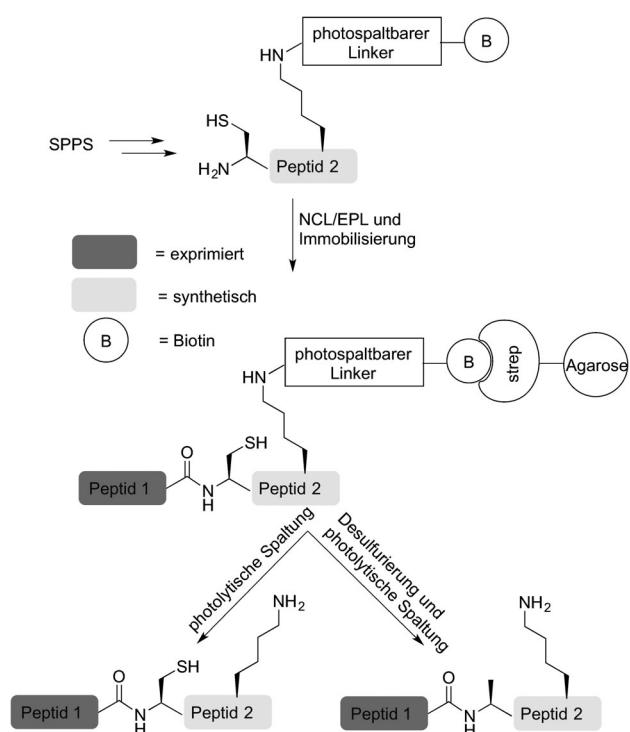
Eine Herausforderung bei EPL-Reaktionen ist der geringe Größenunterschied zwischen dem ligierten Protein und dem exprimierten Proteinsubstrat, was eine Aufreinigung durch konventionelle chromatographische Methoden erschwert. So bietet HPLC-Chromatographie zwar eine relativ hohe Sensitivität der Trennung, erfordert jedoch den Einsatz von organischen Lösungsmitteln, was speziell für gefaltete Proteine ungünstig sein kann. Affinitäts-Tags sind häufig verwendete Alternativen;^[14] allerdings sind diese Tags oft schwierig synthetisch einzuführen (z.B. His-Tag) oder verbleiben kovalent am semisynthetischen Produkt und beeinflussen so möglicherweise die Struktur und Funktion des Proteins. Infolgedessen wurden spurlos spaltbare Tags entwickelt, welche die Aufreinigung synthetischer Peptide und exprimierter Proteine durch eine vorübergehende Immobilisierung an einer festen Phase vermitteln.^[15]

[*] O. Reimann, Prof. Dr. C. P. R. Hackenberger
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP)
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)
und
Humboldt Universität zu Berlin, Department Chemie
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)
und
Freie Universität Berlin, Institut für Chemie und Biochemie
Takustraße 3, 14195 Berlin (Deutschland)
E-Mail: hackenbe@fmp-berlin.de

Dr. C. Smet-Nocca
UMR CNRS 8576, Lille 1 Science and Technology University
59655 Villeneuve d'Ascq Cedex (Frankreich)

[**] Wir danken der DFG (SFB 765, SPP1623), dem Fonds der Chemischen Industrie, der Einstein-Stiftung und der Boehringer-Ingelheim-Stiftung (Plus 3 Award) für finanzielle Unterstützung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201408674> zu finden.



Schema 1. Ligation, Desulfurierung und Aufreinigung von Komponenten aus NCL- und EPL-Reaktionen durch einen photospaltbaren Biotin-Linker.

Hier stellen wir eine neuartige Strategie zur spurlosen Aufreinigung von posttranslational modifizierten und durch NCL oder EPL erzeugten Peptiden und Proteinen vor, die eine finale Desulfurierung ermöglicht, um ein Alanin an der

Ligationsstelle einzubauen (Schema 1). Wir postulierten, dass ein über eine photospaltbare 2-Nitrobenzyl-Gruppe verbrücktes Biotin an einer Lysin-Seitenkette diesen Zweck erfüllen könnte. Trotz herausragender Fortschritte in der Entwicklung spaltbarer Linker bei Festphasen-gestützten Methoden für iterative Proteinligationen^[13] oder der Fluoreszenzmarkierung von Proteinen^[15b-d] haben wir keine Beispiele in der Literatur gefunden, die den Einsatz von spurlos photospaltbarem Biotin (PS-Biotin) bei EPL-Reaktionen dokumentieren, um native Proteine voller Länge zu erhalten oder chemische Transformationen nach der Ligation durchzuführen. Wir haben für die Synthese der angestrebten Peptidkonjugate auf den difunktionellen Linker **1** zurückgegriffen, der ursprünglich von van der Donk et al. zur Abspaltung von Leader-Peptiden verwendet wurde.^[16] Die Synthese von Linker **1** wurde analog dem literaturbekannten Protokoll durchgeführt und ergab eine Ausbeute von 39 % über vier Schritte. Um zu prüfen, ob **1** in Kombination mit Biotin als eine gute photospaltbare Einheit fungiert, indem es nämlich eine hohe Affinität zu Streptavidin zeigt, mit Licht niedriger Intensität und kurzer Expositionszeit gespalten wird und das Produkt in nativer Form freigesetzt,^[15a] haben wir **1** in ein durch Fmoc-basierte Festphasenpeptidsynthese (SPPS) erzeugtes Peptid eingebaut (siehe Abbildung 1 und Hintergrundinformationen). Linker **1** wurde durch Inkubation mit dem Peptid und Base an eine orthogonal entschützte Lysin-Seitenkette gekuppelt. Dann wurden Biotin, Hydroxybenzotriazol (HOBr) und *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) in *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) in Anwesenheit von Tri-*n*-butylphosphin zugefügt, was die In-situ-Reduktion des Azids zum Amin bewirkte. Wir erhielten das Modellpeptid in 7 % Ausbeute und hoher Reinheit. Das Potential des Biotin-gekoppelten Linkers **1** für Abspaltungsreaktionen wurde ge-

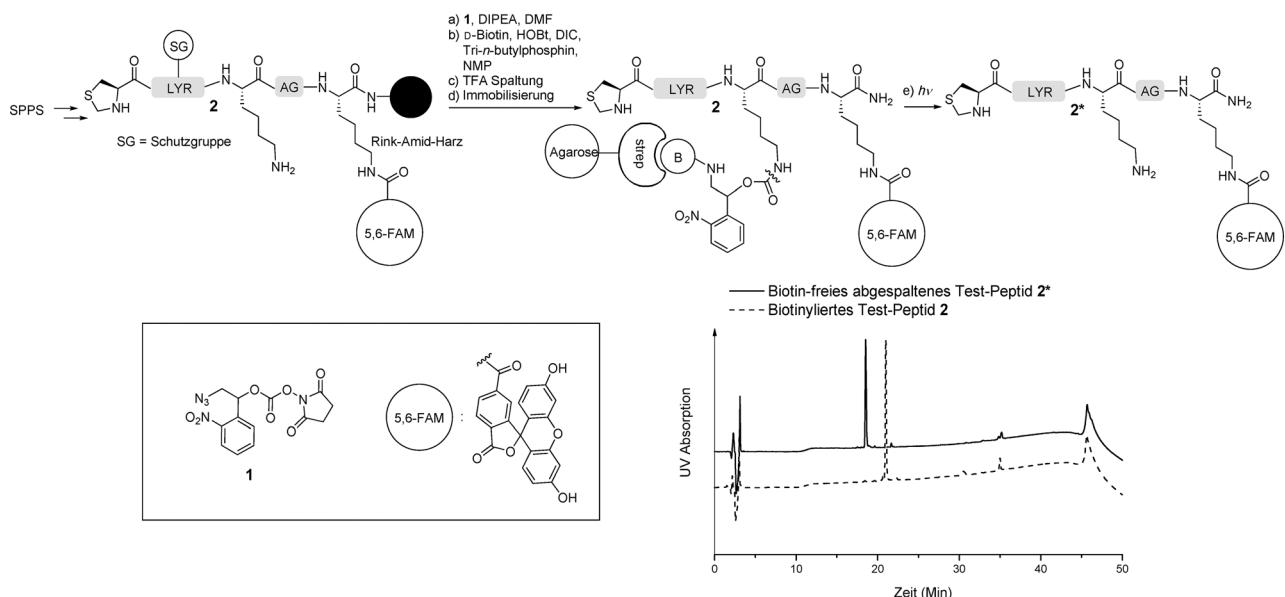


Abbildung 1. UV-Spaltung von photospaltbarem Biotin in Testpeptid **2** (siehe Hintergrundinformationen für experimentelle Details): a) Kupplung von **1**; DIPEA = *N,N*-Diisopropylethylamin; b) In-situ-Reduktion und Eintopf-Biotinkupplung; NMP = *N*-Methyl-2-pyrrolidon; c) Abspaltung vom Harz mit TFA; d) Immobilisierung auf Streptavidinpartikeln; e) photolytische Spaltung durch UV-Strahlung ($\lambda = 297 \text{ nm}$, 7 min); HPLC-UV-Spuren des Testpeptids **2** (m/z : 871.5 [$M+2\text{H}]^{2+}$, ber. m/z : 871.4) und des abgespaltenen Testpeptids **2*** (m/z : 654.3 [$M+2\text{H}]^{2+}$, ber. m/z : 654.3).

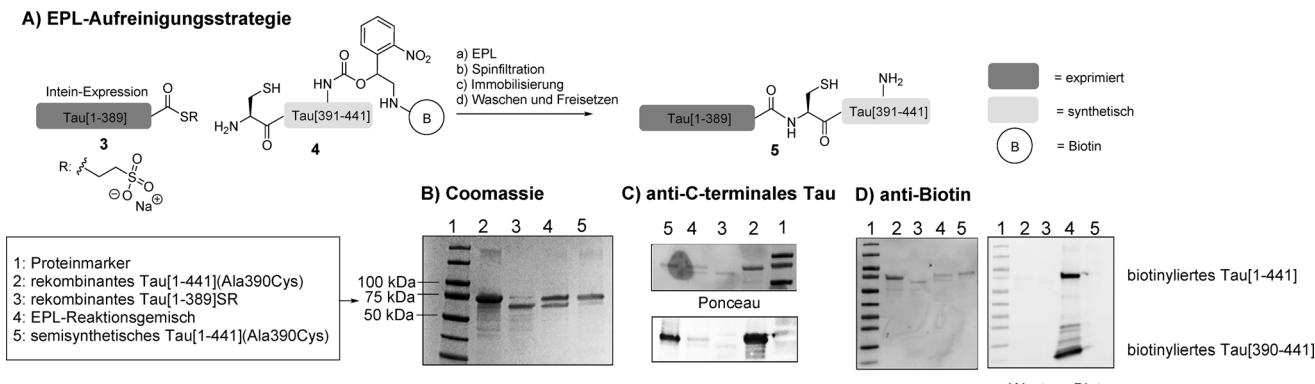


Abbildung 2. A) Tag-freie Aufreinigung von semisynthetischem Tau 5 (siehe Hintergrundinformationen für experimentelle Details): a) EPL; b) Spinfiltration (Cutoff 30 kDa); c) Bindung an Streptavidin-beschichtete Partikel; d) Waschen und UV-Bestrahlung ($\lambda = 297$ nm); B) mit Coomassie Brilliant Blue gefärbtes SDS-PAGE-Gel; C) anti-C-terminaler Tau-Western-Blot; D) anti-Biotin-Western-Blot.

testet, indem mit Streptavidin beschichteten Partikeln inkubiert wurde. Die photolytische Abspaltung wurde durch Fluoreszenzmessungen verfolgt und ergab eine Ausbeute von 82 % unbiotinyliertem Peptid 2* in nur 5 Minuten (Abbildung S18 und Tabelle S4 in den Hintergrundinformationen). Die Verwendung von Agarosepartikeln war essentiell, da photolytisch abgespaltene Peptide von Azlacton-aktiviertem Polyacrylamidharz verschiedene Nebenprodukte aufwiesen (Abbildungen S27 und S28).

Basierend auf diesen Ergebnissen untersuchten wir die mögliche Anwendung dieses Systems bei einer EPL. Wir haben kürzlich über die erste Semisynthese der längsten Isoform von humanem Tau-Protein berichtet (441 Aminosäuren),^[17] einer Schlüsselverbindung in der Alzheimer-Forschung.^[18] In diesem Verfahren wurde Biotin irreversibel in den C-Terminus des Proteins an Position Lys438 für eine finale Aufreinigung eingeführt. Durch die Anwendung unserer spürlosen Aufreinigung verfolgten wir das Ziel, kovalent gebundenes Biotin zu entfernen und durch effizientes Freisetzen von semisynthetischem natürlichem Tau-Protein 5 von Streptavidin-beschichteten Partikeln unter milden Bedingungen in einem Puffer freier Wahl eine Tag-freie Semisynthese von Tau zu realisieren (Abbildung 2A). Die gewählte Ligationsstelle zwischen Gly389 und Ala438 erforderte eine Punktmutation von Ala390 zu Cys, wobei bereits zuvor gezeigt wurde, dass diese Mutation in Tau die Eigenschaft Tubulin zu polymerisieren nicht beeinflusst.^[17] Das synthetische Fragment Tau[390-441](Ala390Cys) (4) wurde durch lineare Fmoc-basierte SPPS generiert, bei der Lys438 mit einer orthogonalen Alloc-Seitenkettenschutzgruppe für die ortsspezifische Einführung von PS-Biotin eingebaut wurde. Das Peptid wurde in guter Reinheit und mit einer Ausbeute von 8.6 mg (3 %) in einem 0.1-mmol-Ansatz erhalten. Der rekombinante α -Thioester 3 (Tau[1-389]SR) wurde, wie zuvor beschrieben,^[17] in situ durch die Zugabe von MESNa zum Intein-Fusionsprotein generiert, und simultane Peptidzugabe leitete die EPL ein. Nach zwei Tagen wurde das EPL-Gemisch von der Säule eluiert und mit SDS-PAGE untersucht, wobei eine Ligationseffizienz von etwa 70 % festgestellt wurde (Abbildung 2B, Spalte 4). Zuerst wurde überschüssiges Peptid (5.8 kDa) durch Spinfiltration (Cutoff 30 kDa)

entfernt, was einen gleichzeitigen Pufferaustausch für die nachfolgende Bindung an Streptavidin ermöglichte. Nach 3 h Inkubation wurden die Partikel gewaschen, und das Ligationsprodukt 5 wurde durch UV-Bestrahlung ($\lambda = 297$ nm) freigesetzt, wobei sich eine Ausbeute von 0.95 mg reinem semisynthetischem Protein aus einem Expressionsvolumen von 0.6 L ergab (siehe Hintergrundinformationen). Wir konnten die Identität des Proteins 5 eindeutig durch einen anti-C-terminalen Tau-Western-Blot (Abbildung 2C) und MALDI-TOF-Spektrometrie (Abbildung S21) bestimmen. Zuletzt gelang der Nachweis vollständiger Biotinabspaltung vom Protein durch einen anti-Biotin-Western-Blot (Abbildung 2D, Spalte 4).

Die Tatsache, dass Streptavidin keine Cysteine enthält, veranlasste uns, die praktische, schnelle und spurlose Aufreinigungsstrategie um eine Desulfurierung zu erweitern. Hierzu synthetisierten wir die beiden Peptide Tau[421-425] (6) mit C-terminalen N-Acylbenzimidazolin (Nbz) als Thioester-Vorstufe^[19] und Tau[426-441] (7) mit N-terminalen Cys anstelle des Ala aus der C-terminalen Sequenz des Tau-Proteins, ausgestattet mit PS-Biotin (Abbildung 3). Eine erfolgreiche NCL an Position 426 mit nachfolgender Desulfurierung zwischen diesen beiden Peptiden würde eine Optimierung der Synthese C-terminal modifizierter Varianten von Tau bedeuten. Wir führten die Ligation in einem Puffer mit 6 M Guanidinhydrochlorid (Gn·HCl), 200 mM NaH₂PO₄, 200 mM MPAA und 10 mM TCEP bei pH 7.2 mit einem 1.5-fachen Überschuss an Peptid 6 durch. Die Reaktion wurde nach 90 min beendet, da die vollständige Umsetzung des PS-Biotin enthaltenden Peptids 7 beobachtet wurde. Eine Verdünnung der NCL-Lösung mit Wasser war unbedingt notwendig, um die hohe Bindungsaffinität von Biotin zu Streptavidin zu beibehalten ($K_d \approx 10^{-14}$ mol L⁻¹), die bei Gn·HCl-Konzentrationen von 4 M und höher herabgesetzt wird.^[20] 1 h Inkubation der verdünnten Ligationsmischung mit Streptavidinpartikeln führte zur vollständigen Immobilisierung des Ligationsprodukts. Die homogene radikalische Desulfurierung wurde direkt auf den Partikeln durchgeführt und verlief quantitativ innerhalb 1 h bei Raumtemperatur. Daraufhin wurde die Lösung abfiltriert, und die Partikel wurden gewaschen und dreimal für 5 min mit UV-Licht ($\lambda = 297$ nm) be-

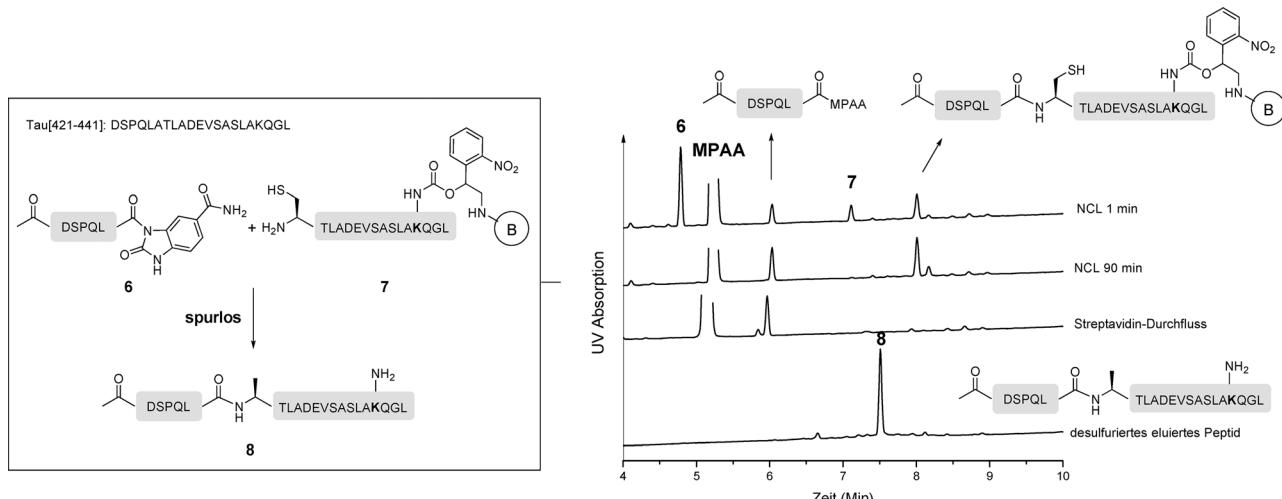


Abbildung 3. NCL, Immobilisierung und Desulfurierung, verfolgt durch UPLC-UV/MS.

strahlt (siehe Hintergrundinformationen). Wir konnten eine exzellente isolierte Ausbeute von Peptid **8** von 97 % (basierend auf Peptid **7**) ohne HPLC-Aufreinigung und mit minimalem Zeitaufwand erzielen.

Wir wollten nun den Nutzen dieser NCL-Schnittstelle erweitern und das synthetisch anspruchsvolle, an Ser396, 400 und 404 phosphorylierte Peptid Tau[390–441] generieren (Abbildung 4). Die betreffenden Serine liegen bei Alzheimer-Patienten stark phosphoryliert vor.^[21] In einer früheren Studie haben wir solche dreifach phosphorylierten Peptide

durch enzymatische Phosphorylierung erzeugt, was jedoch zur Bildung heterogener Gemische mit unterschiedlichen Phosphorylierungsmustern führte.^[22] Um unser Ziel zu erreichen, nutzten wir die zuvor etablierte NCL an Position 426 zwischen Peptid **7** und dem dreifach phosphorylierten Peptid **9**, das wir durch Standard-SPPS erhielten. Es ist wichtig festzuhalten, dass wir zuvor nicht in der Lage waren, Peptid **10** durch lineare Synthese zu generieren (Daten nicht gezeigt). Desulfurierung und Biotin-basierte Aufreinigung ergaben Peptid **10** in einer Ausbeute etwa 70 % gemäß UV-Spektren. Verbleibende Verunreinigungen konnten teils auf Abbruchsequenzen des durch SPPS generierten Ausgangsmaterials zurückgeführt werden, die nicht durch HPLC entfernt werden konnten. Eine finale HPLC-Aufreinigung erbrachte eine isolierte Ausbeute von 45 % in hoher Reinheit (> 95 %).

Zusammenfassend haben wir eine photo-spalbare Biotin-Lys-Verbrückung genutzt, um ein praktisches Protokoll zur Erleichterung chemischer Umwandlungen nach der Proteinligation und zur spurlosen Aufreinigung von Peptiden und Proteinen zu etablieren. So waren wir in der Lage, sowohl Tag-freies semisyntetisches Tau-Protein als auch dreifach phosphoryliertes, 52 Aminosäuren langes C-terminales Tau-Peptid zu generieren. Die unkomplizierte Synthese und ortsspezifische Implementierung in Peptide, die günstige Angleichung zwischen NCL- und Desulfurierungsbedingungen und die guten Absalteigenschaften machen diesen Linker zu einem nützlichen Werkzeug für die Immobilisierung und spurlosen Aufarbeitung von NCL-Reaktionen.

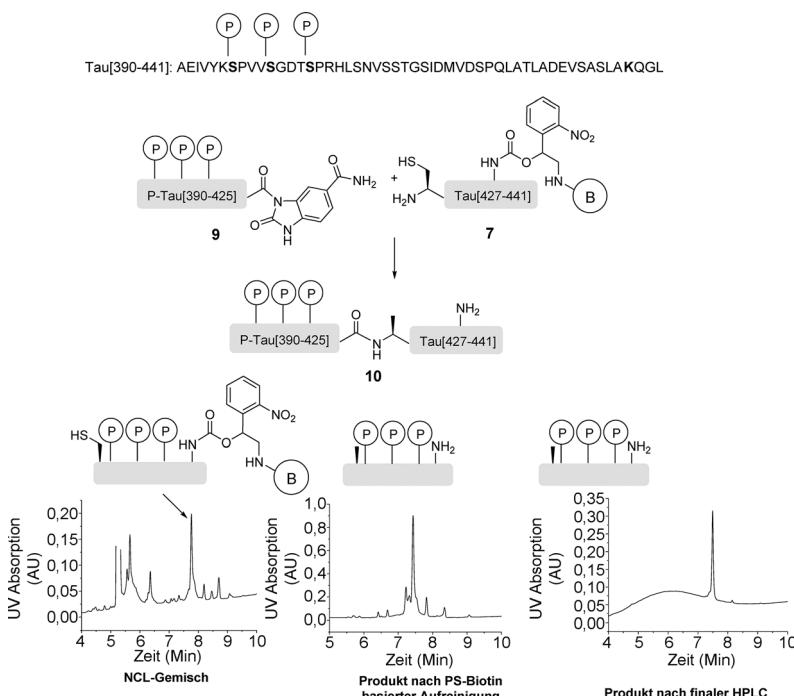


Abbildung 4. Spurlose NCL/Desulfurierung von Tau[390–425]-Nbz (**9**, 1,5 Äquiv.) und Tau[426–441] (**7**, 1 Äquiv.) mit PS-Biotin. Desulfurierungsprodukt Tau[390–441](pS396/400/404), aufgereinigt durch C18-HPLC (Acetonitril/Wasser-Gradient) und isoliert in einer Ausbeute von 45 %.

Eingegangen am 29. August 2014
Online veröffentlicht am 17. November 2014

Stichwörter: Desulfurierung · Native chemische Ligation · Peptidaufreinigung · Photospaltbares Biotin · Spurlose Linker

- [1] a) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, 266, 776; b) T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 6705; c) C. P. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 10030; *Angew. Chem.* **2008**, 120, 10182; d) R. J. Payne, C. H. Wong, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 21; e) D. P. Gamblin, E. M. Scanlan, B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 131.
- [2] G. S. Beligere, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12079.
- [3] J. W. Blankenship, P. E. Dawson, *J. Mol. Biol.* **2003**, 327, 537.
- [4] W. Y. Lu, M. A. Starovasnik, J. J. Dwyer, A. A. Kossiakoff, S. B. H. Kent, W. Y. Lu, *Biochemistry* **2000**, 39, 3575.
- [5] J. Wilken, D. Hoover, D. A. Thompson, P. N. Barlow, H. McSparron, L. Picard, A. Wlodawer, J. Lubkowski, S. B. H. Kent, *Chem. Biol.* **1999**, 6, 43.
- [6] K. Tripsianes, N. K. Chu, A. Friberg, M. Sattler, C. F. W. Becker, *ACS Chem. Biol.* **2014**, 9, 347.
- [7] L. Z. Yan, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 526.
- [8] Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 9248; *Angew. Chem.* **2007**, 119, 9408.
- [9] P. Siman, O. Blatt, T. Moyal, T. Danieli, M. Lebendiker, H. A. Lashuel, A. Friedler, A. Brik, *ChemBioChem* **2011**, 12, 1097.
- [10] K. M. Cergol, R. E. Thompson, L. R. Malins, P. Turner, R. J. Payne, *Org. Lett.* **2014**, 16, 290.
- [11] T. Moyal, H. P. Hemantha, P. Siman, M. Refua, A. Brik, *Chem. Sci.* **2013**, 4, 2496.
- [12] R. E. Thompson, X. Liu, N. Alonso-Garcia, P. J. Pereira, K. A. Jolliffe, R. J. Payne, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 8161.
- [13] M. Jbara, M. Seenaiah, A. Brik, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 12534.
- [14] N. Singla, J. P. Himanen, T. W. Muir, D. B. Nikolov, *Protein Sci.* **2008**, 17, 1740.
- [15] a) J. Olejnik, S. Sonar, E. Krzymanskaolejnik, K. J. Rothschild, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 7590; b) V. Aucagne, I. E. Valverde, P. Marceau, M. Galibert, N. Dendane, A. F. Delmas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 11320; *Angew. Chem.* **2012**, 124, 11482; c) C. F. Portal, J. M. Seifert, C. Buehler, N. C. Meissner-Kober, M. Auer, *Bioconjugate Chem.* **2014**, 25, 1213; d) D. Bang, S. B. H. Kent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 5014; e) T. Koopmans, F. J. Dekker, N. I. Martin, *RSC Adv.* **2012**, 2, 2244; f) W. P. Heal, E. W. Tate, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 731; g) H. Y. Kim, K. A. Tallman, D. C. Liebler, N. A. Porter, *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, 8, 2080; h) C. Thiele, F. Fahrenholz, *Anal. Biochem.* **1994**, 218, 330; i) H. Yonezawa, Y. Nishiyama, K. Takeo, T. Iwatsubo, T. Tomita, S. Yokoshima, T. Fukuyama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 2831.
- [16] N. Bindman, R. Merkx, R. Koehler, N. Herrman, W. A. van der Donk, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 8935.
- [17] M. Broncel, E. Krause, D. Schwarzer, C. P. Hackenberger, *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 2488.
- [18] E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, 2, a006247.
- [19] J. B. Blanco-Canosa, P. E. Dawson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 6851; *Angew. Chem.* **2008**, 120, 6957.
- [20] T. Sano, M. W. Pandori, X. M. Chen, C. L. Smith, C. R. Cantor, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 28204.
- [21] a) L. Martin, X. Latypova, F. Terro, *Neurochem. Int.* **2011**, 58, 458; b) G. Lippens, A. Sillen, I. Landrieu, L. Amniai, N. Sibille, P. Barbier, A. Leroy, X. Hanoullle, J. M. Wieruszkeski, *Prion* **2007**, 1, 21.
- [22] C. Smet-Nocca, M. Broncel, J. M. Wieruszkeski, C. Tokarski, X. Hanoullle, A. Leroy, I. Landrieu, C. Rolando, G. Lippens, C. P. Hackenberger, *Mol. BioSyst.* **2011**, 7, 1420.