

Polymorphie in einem amyloidartige Fibrillen bildenden Modellpeptid**

René Verel, Ivan T. Tomka, Carlo Bertozzi, Riccardo Cadalbert, Richard A. Kammerer, Michel O. Steinmetz und Beat H. Meier*

Die Umwandlung löslicher Peptide und Proteine in Amyloidfibrillen geht oft mit pathologischen Erscheinungen wie neurodegenerativen Krankheiten oder systemischer Amyloidose einher.^[1] Amyloidfibrillen sowie andere, nicht mit Krankheiten assoziierte amyloidartige Fibrillen können aus Peptiden und Proteinen mit sehr verschiedenen Aminosäuresequenzen aufgebaut sein.^[2] Trotzdem existieren gemeinsame Merkmale. Ein Kennzeichen von Amyloid- und amyloidartigen Fibrillen ist die Bildung hoch geordneter Cross- β -Strukturen aus β -Strängen, die rechtwinklig zur Fibrillenachse verlaufen. Ein weiteres Charakteristikum ist, dass Fibrillen eines bestimmten Proteins oder Peptids mehrere Morphologien ausbilden können. Diese strukturelle und morphologische Vielfalt von Fibrillen könnte die molekulare Basis für die Bildung verschiedener Stämme bei Prionen sein und in diversen Amyloiderkrankungen eine Rolle spielen.^[3-5] Die Ursache der Polymorphie von Amyloidfibrillen ist weitgehend unbekannt, doch es gibt spektroskopische Hinweise darauf, dass spezifische Änderungen in der Konformation und dem Packungsschema der einzelnen Polypeptide beteiligt sind.^[6-8] Die Bildung verschiedener Polymorphe kann teilweise von außen gesteuert werden: einerseits durch Variation der Fibrillisierungsbedingungen,^[9,10] anderseits durch Animpfen mit Keimen einer bestimmten Morphologie, was die ganze Probe dazu bringen kann, diese eine Morphologie einzunehmen. Daher ist es sehr wichtig zu wissen, welche Faktoren die Polymorphie von Amyloidfibrillen bestimmen, um Amyloid- und Prionerkrankungen auf molekularer Ebene zu verstehen.^[1]

Hier wird die molekulare Grundlage der Fibrillenpolymorphie an dem de novo konstruierten Modellpeptid $\text{cc}\beta\text{-p}$ ^[11,12] untersucht. Frühere Studien haben gezeigt, dass $\text{cc}\beta\text{-p}$ (Ac-SIRELEARIRELELRIG-NH₂) bei tiefer Temperatur in Wasser löslich ist und in einer dreisträngigen α -helicalen „Coiled-coil“-Struktur vorliegt. Beim Erwärmen findet eine irreversible Umwandlung in Amyloidfibrillen statt.^[11] Amyloidfibrillen, die in einer gepufferten wässrigen Lösung bei pH 7.3 gebildet wurden, weisen eine Cross- β -Konformation^[13] auf, in der die β -Stränge antiparallele β -Faltblätter aufbauen. Die β -Stränge sind um drei Aminosäurereste aus einer „In-Register“-Anordnung verschoben (Abbildung 1 b und 1 d). Wir bezeichnen dieses Anordnung als „+ 3 out-of-register“ („+ 3-or“).^[26] Dieses Muster wird, zusätzlich zur vorteilhaften Wechselwirkung zwischen den hydrophoben Seitenketten, durch Salzbrücken zwischen den geladenen Seitenketten von Glu und Arg stabilisiert.^[11,12,14,15] Deshalb kann vermutet werden, dass eine Protonierung der Glu-Seitenketten bei niedrigem pH-Wert eine Registerveränderung bewirkt.

Dank der starken Abhängigkeit der Dipolwechselwirkung vom Abstand (mit dem Kehrwert der dritten Potenz) ist Festkörper-NMR-Spektroskopie – präziser das „Rotational Echo Double Resonance“ (REDOR)-Experiment^[16,17] – eine ideale Methode, um das Register der β -Stränge in der Amyloidfibrille eindeutig zu bestimmen. Der Abstand zwischen dem Carbonylkohlenstoffatom und dem Amidstickstoffatom beträgt ca. 4.2 Å, wenn die beiden Aminosäurereste über Wasserstoffbrücken verbunden sind, andernfalls ist er größer als 5.5 Å. Falls die untersuchten Proben nun selektiv mit einem ¹³C und ¹⁵N markiert sind und der gemessene Abstand ca. 4.2 Å beträgt, so ist das Register eindeutig bestimmt.

Um die Struktur der amyloidartigen $\text{cc}\beta\text{-p}$ -Fibrillen zu untersuchen, wurden isotopenmarkierte Substanzen hergestellt. Im Weiteren stellten sich die Messresultate folgender Substanzen als interessant heraus: Bei Substanz I war Ala7, bei Substanz II Ile2 mit ¹⁵N markiert. Beide Substanzen enthielten zudem eine ¹³C-Markierung am Carbonylkohlenstoffatom von Leu14. Für Substanz I erwartet man eine starke REDOR-Dephasierung, falls sich die „+ 3-or“-antiparallele β -Faltblattstruktur bildet, die bei pH 7.3 existiert,^[11] für Substanz II falls die „-2-or“-Form vorliegt, die, wie wir noch zeigen werden, bei tiefem pH-Wert entsteht (Abbildung 1).

Abbildung 2 zeigt die REDOR-Dephasierung von Fibrillen der Substanz I, die bei verschiedenen pH-Werten präpariert wurden. Die Dephasierung nimmt mit steigendem pH-Wert zu (von 2.0 bis 7.3), weil ein größerer Anteil der Fibrillen als „+ 3-or“-Polymorph vorliegt, das im neutralen pH-Bereich die Hauptform darstellt.

[*] Dr. R. Verel, I. T. Tomka, C. Bertozzi, R. Cadalbert, Prof. B. H. Meier
Physikalische Chemie, ETH Zürich

Wolfgang-Pauly-Strasse 10, 8093 Zürich (Schweiz)
Fax: (+41) 44-632-1621

E-Mail: reve@nmr.phys.chem.ethz.ch
beme@nmr.phys.chem.ethz.ch

Homepage: <http://www.ssnmr.ethz.ch>

Dr. R. A. Kammerer
Wellcome Trust Centre for Cell-Matrix Research
Faculty of Life Sciences, University of Manchester
Michael Smith Building
Oxford Road, M13 PT, Manchester (Großbritannien)

Dr. M. O. Steinmetz
Biomolecular Research, Structural Biology
Paul Scherrer Institut, PSI, 5232 Villigen (Schweiz)

[**] Die Autoren danken B. Bianchi für die Synthese zahlreicher Proben.
Diese Arbeit wurde finanziell vom Schweizerischen Nationalfonds und der ETH Zürich unterstützt.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200800021> zu finden.

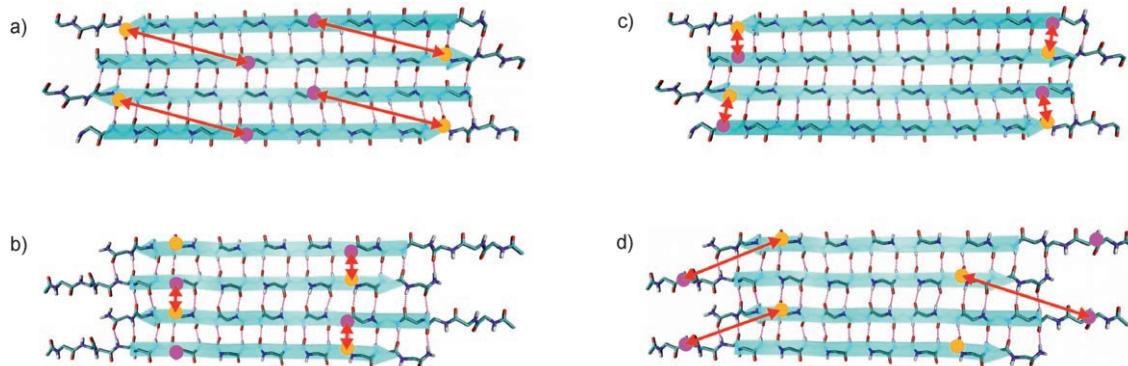


Abbildung 1. Modelle der beiden β -Faltblattstrukturen (ohne Seitenketten) der cc β -p-Fibrillen mit den beiden Schemata für die Isotopenmarkierung. a,b) cc β -p mit den selektiven Isotopenmarkierungen ^{15}N am Amidstickstoffatom von Ala7 (magenta) und ^{13}C am Carbonylkohlenstoffatom von Leu14 (orange). c,d) cc β -p mit den selektiven Isotopenmarkierungen ^{15}N am Amidstickstoffatom von Ile2 (magenta) und ^{13}C am Carbonylkohlenstoffatom von Leu14 (orange). Die Strukturen in (a) und (c) zeigen beide jenes Register des β -Faltblatts, das der vorrangigen Form der Fibrillen bei $\text{pH} \approx 2$ entspricht, die in (b) und (d) hingegen jenes Register des β -Faltblatts, das der vorrangigen Form der Fibrillen entspricht, die im neutralen pH-Bereich gebildet wurden. Die roten Pfeile symbolisieren jeweils den kleinsten Abstand zwischen den ^{15}N - und ^{13}C -Markierungen innerhalb eines β -Faltblatts.

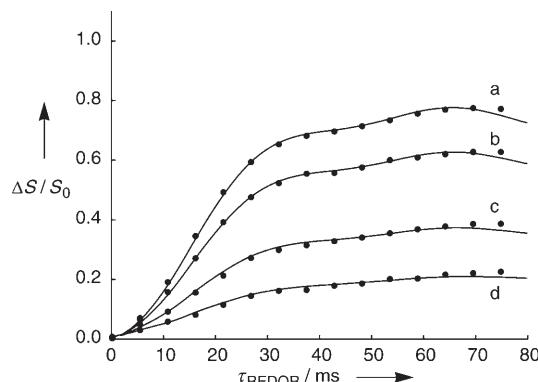


Abbildung 2. Experimentelle REDOR-Dephasierung von ^{15}N -Ala7- und ^{13}C -Leu14-markiertem cc β -p (Punkte) und die besten Anpassungen durch numerische Simulationen einer Modellstruktur des β -Faltblatts (Linie). Die Fibrillen wurden in Lösungen mit pH 7.3 (a), pH 5.5 (b), pH 3.5 (c), pH 2.0 (c) präpariert.

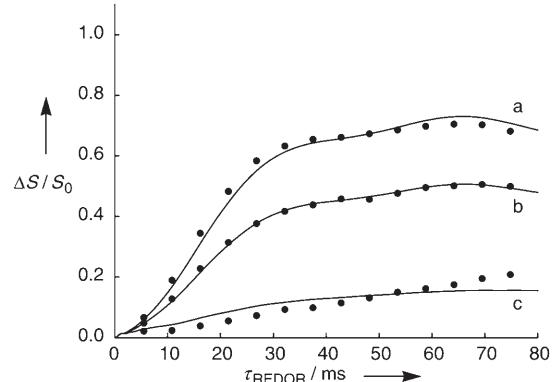


Abbildung 3. Experimentelle REDOR-Dephasierung von ^{15}N -Ile2- und ^{13}C -Leu14-markiertem cc β -p (Punkte) und die besten Anpassungen durch numerische Simulationen einer Modellstruktur des β -Faltblatts (Linie). Die Fibrillen wurden in Lösungen mit pH 2.0 (a), pH 3.5 (b), pH 7.3 (c) präpariert.

In Abbildung 3 sind die REDOR-Daten der Substanz II zu sehen. Für Proben, die bei tiefem pH-Wert fibrillisiert wurden, erhält man eine starke REDOR-Dephasierung, was die Existenz der „-2-or“-Struktur anzeigt.

Die ausgezogenen Linien in Abbildung 2 und 3 bezeichnen die beste Anpassung an die Daten mithilfe eines Modells, in dem die Dephasierung durch eine Überlagerung der Dephasierungskurven für „+3-or“ und „-2-or“ beschrieben wird. Diese Vorgehensweise ist gerechtfertigt, da Substanz I praktisch keine REDOR-Dephasierung für die „-2-or“-Struktur ergibt und Substanz II keine für die „+3-or“-Struktur (Abstand im Faltblatt $> 17 \text{ \AA}$, zwischen den Faltblättern $> 9 \text{ \AA}$). Der einzige freie Parameter in der Optimierung ist die relative Häufigkeit der beiden Register.^[18]

Die Analyse der REDOR-Resultate für die beiden Substanzen und den jeweiligen pH-Wert sind in der Tabelle 1 aufgelistet. Es wurde gefunden, dass sich die Fraktionen der beiden Register bei jedem pH-Wert in guter Näherung zu

Tabelle 1: Fraktion des jeweiligen Registers als Funktion des pH-Werts der Lösung während der Fibrillierung^[a]

pH-Wert	Markierungsschema von cc β -p ^[b]	
	Substanz I ^{15}N -Ala7, ^{13}C -Leu14 („+3-or“-Fraktion)	Substanz II ^{15}N -Ile2, ^{13}C -Leu14 („-2-or“-Fraktion)
2.0	0.167 ± 0.020	0.840 ± 0.040
3.5	0.381 ± 0.021	0.550 ± 0.012
5.5	0.771 ± 0.019	– ^[c]
7.3	0.896 ± 0.017	0.102 ± 0.058

[a] Bestimmt mithilfe einer optimierten Anpassung an die Daten für die beiden Proben. [b] REDOR-Spektren sind nur auf eines der Markierungsschemata empfindlich. [c] Nicht bestimmt.

100 % addieren. Daher kann man davon ausgehen, dass nur diese beiden Register vorkommen.

Bei pH 2.0 und 7.3 liegt jeweils hauptsächlich ($> 80\%$) eines der beiden Register vor. Dazwischen findet ein gradu-

eller Übergang von „-2-or“ zu „+3-or“ statt. Für Proben, die bei pH 3.5 fibrilliert wurden, ist die Koexistenz beider Register mit signifikanten Anteilen (0.38 und 0.55) zu beobachten. Die charakteristische Form der REDOR-Dephasierungskurven bei mittleren pH-Werten unterstützt ein Modell, in dem jedes Register in unterschiedlichen Fibrillen existiert. Alternativ könnten die Register aber auch größere Bereiche einer einzigen Fibrille bilden. Mit den hier präsentierten Daten kann nicht zwischen den beiden möglichen Strukturen unterschieden werden. Es ist jedoch auszuschließen, dass eine rein zufällige Durchmischung der Register stattfindet.

Die Registerverschiebung als Funktion des pH-Werts während der Fibrillisierung folgt vermutlich aus dem Protionierungszustand der Glutaminsäure-Seitenkette. Im neutralen pH-Bereich sind diese Seitenketten negativ geladen. Die Ladungskompensation zwischen den Glutaminsäure- und den Arginin-Seitenketten sowie eine optimale hydrophobe Wechselwirkung der Leucin-, Isoleucin- und Alanin-Seitenketten begünstigt die „+3-or“- β -Faltblattstruktur (Abbildung 4b). Diese Anordnung führt zu einem β -Faltblatt mit

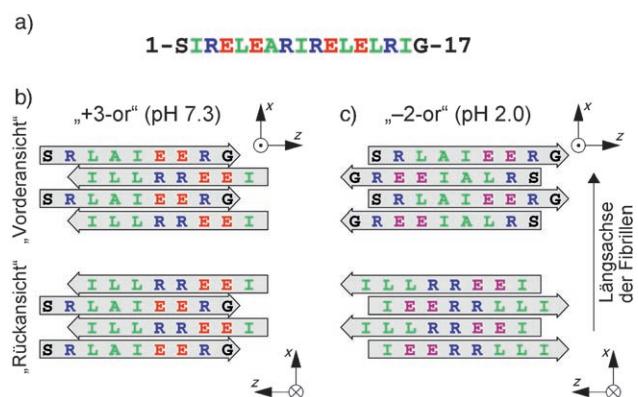


Abbildung 4. a) Die β -Faltblattstrukturen von cc β -p. Die einzelnen Buchstaben bezeichnen die Primärstruktur, die Farben die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Seitenketten (rot: negativ geladen; blau: positiv geladen; grün: hydrophob; schwarz: andere). b,c) Die antiparallelen β -Faltblattstrukturen von cc β -p für „+3-or“ (b) und „-2-or“ (c). Vorder- und Rückseite des jeweiligen Registers sind dargestellt. Nur diejenigen Aminosäuren sind gezeigt, deren Seitenketten abhängig von der Blickrichtung über der Ebene des β -Faltblatts liegen. Die Glutaminsäurereste sind in (c) violett markiert, da sie bei pH 2.0 mehrheitlich protoniert und nicht mehr negativ geladen vorliegen. Das Koordinatensystem soll hervorheben, dass eine Rotation um die x-Achse genutzt wurde, um die beiden β -Faltblattseiten zu zeigen.

zwei identischen Seiten (für ein unendlich langes Faltblatt). Bei pH 2.0 liegen die Glutaminsäure-Seitenketten ungeladen vor. Dies führt zu einer alternativen Anordnung (Abbildung 4c), die sich experimentell als die stabilste Form erwiesen hat. Diese „-2-or“- β -Faltblattstruktur hat zwei unterschiedliche Seiten: eine Vorder- und eine Rückseite, mit einer zentralen hydrophoben Stelle entlang der Mitte der Vorderseite und einer hydrophoben Stelle entlang den Enden der Rückseite.

Reissverschluss-Motive, die Cross- β -Fibrillen bilden, können nach einem kürzlich beschriebenen Schema klassifiziert werden.^[19] Für eine solche Klassifizierung benötigt man

zusätzliche Informationen zur Schichtung von β -Faltblättern in der Fibrille (entlang der y-Achse in Abbildung 4), die aus unseren REDOR-Experimenten nicht hervorgehen. Aufgrund von Röntgenbeugungsdaten schlugen Kammerer et al.^[11] vor, dass in der „+3-or“-Struktur die β -Stränge zwischen den β -Faltblättern antiparallel geschichtet sind. Dieselbe Schichtung wurde für das mit cc β -p nahe verwandte cc β -Met (fibrilliert bei pH 7.3) vorgeschlagen.^[15] Danach gehören cc β -p-Fibrillen, die in „+3-or“- β -Faltblattstruktur vorliegen, zur Klasse 8.^[19] Diese Klasse wird definiert über β -Faltblätter, die aus antiparallelen β -Strängen aufgebaut sind, deren beide Faltblattseiten identisch sind und deren einzelne β -Stränge antiparallel geschichtet vorliegen. Die alternative parallele Schichtung (Klasse 7) ist nicht nur aus energetischen Gründen ungünstig, sondern widerspricht auch den Resultaten aus Röntgenbeugungsstudien. Dagegen haben die β -Faltblätter der „-2-or“-Struktur (die bei pH 2.0 vorherrscht) eine Vorder- und eine Rückseite. Sie fallen deshalb entweder in Klasse 5 oder 6,^[19] je nachdem, wie die einzelnen β -Faltblätter geschichtet sind. Keine dieser beiden Klassen konnte bisher kristallographisch mit Röntgenbeugungsmethoden nachgewiesen werden, aber Hinweise auf ihre Existenz wurden in Festkörper-NMR-Spektren gefunden.^[20,21] Wir haben keine experimentellen Daten, die zwischen den beiden Klassen unterscheiden können, betrachtet man aber die Verteilung der hydrophoben Seitenketten auf den beiden Seiten des β -Faltblatts, so scheint eine Schichtung von Vorder- auf Vorderseite bzw. Rück- auf Rückseite (Klasse 5) am wahrscheinlichsten.

Wir haben die Faktoren untersucht, die das Gleichgewicht zwischen zwei antiparallelen β -Faltblattkonformationen derselben Peptidsequenz beeinflussen. Bei tiefen pH-Werten wird eine „-2-or“-Anordnung beobachtet, im neutralen pH-Bereich liegt hauptsächlich eine „+3-or“-Anordnung vor. Festkörper-NMR-Spektren von Fibrillen, die zwischen pH 2.0 und pH 7.3 präpariert wurden, konnten als Mischung dieser beiden Registerarten beschrieben werden. Die pH-Abhängigkeit der Quartärstruktur der Fibrillen zeigt, dass kleine Veränderungen auf molekularer Ebene, wie die Protonierung von Seitenketten, einen großen Effekt auf die Fibrillenstruktur haben. Ein grundlegendes Verständnis dieser Polymorphie könnte zur Aufklärung von Amyloid- und Prionenerkrankungen beitragen.

Experimentelles

Die beiden spezifisch $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -markierten Varianten des cc β -p Peptids (Substanz I und II) wurden durch automatisierte Festphasensynthese (Applied Biosystems 433 A) produziert. Das Rohprodukt wurde mithilfe von Umkehrphasen-HPLC gereinigt. Die Molmasse des Produkts wurde mit einer Genauigkeit von 0.1% auf einem MALDI-TOF-Massenspektrometer bestimmt. Einer HPLC-Analyse zufolge wurde das Produkt mit über 95% Reinheit erhalten.

Für die Fibrillenpräparation wurde lyophilisiertes cc β -p-Peptid bei 4°C in Nanopur-Wasser gelöst. Die Konzentration betrug ca. 5 mM. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 0.1 M NaOH oder 0.1 M HCl eingestellt. Alle Proben wurden in Wasser als Lösungsmittel präpariert, nur bei der Fibrillierung bei pH 7.3 wurde ein 20 mM Natriumphosphat-Puffer zugesetzt. Nach Einstellen des pH-Werts wurde die Suspension zentrifugiert, um ungelöstes Material abzu-

trennen. Der Überstand wurde mindestens sechs Stunden bei (43 ± 3) °C inkubiert. Danach wurde die Probe zur vollständigen Fibrillierung drei Minuten auf 90 °C erhitzt. Die Fibrillen wurden durch Zentrifugieren abgetrennt und unter einem schwachen Stickstoffstrom getrocknet.

Alle Festkörper-MAS-NMR-Experimente wurden auf einem Varian/Chemagnetics-Infinity-Spektrometer mit 7-T-Magnet und Dreifachresonanz-Probenkopf gemessen. Um die transversale Relaxationszeit zu verlängern, wurden die Daten bei -80 °C aufgenommen. Die MAS-Frequenz betrug (6000 ± 2) Hz. Eine REDOR-Pulssequenz mit einem einzelnen π -Puls pro Rotorperiode auf dem ^{13}C -sowie auf dem ^{15}N -Kanal wurde verwendet.^[16,17] Die Pulse auf den beiden Kanälen waren um eine halbe Rotorperiode gegeneinander verschoben. Ein XY-8^[22]-Phasenzyklus kam zur Anwendung, um den Effekt von Pulsungsgenauigkeiten zu vermindern. Die REDOR-Dephasierungszeit wurde von 0 bis 74.67 ms in Schritten von 5.33 ms inkrementiert.

Freie Induktionszerfälle für dephasierte und nichtdephasierte (^{15}N -Pulsamplitude auf Null gesetzt) Signale wurden separat aufgenommen. Die Daten wurden mit speziell geschriebenen Matlab-Skripts prozessiert. Die Simulationen wurden mit einer Kombination von Matlab- und C++-Skripts berechnet.^[23] Die Modellstrukturen für die Simulationen wurden mit CYANA^[24] generiert. Die Visualisierung der Modellstrukturen in Abbildung 1 erfolgte mit der Visual-Molecular-Dynamics(VMD)-Software.^[25] Weitere experimentelle Details sind in den Hintergrundinformationen gegeben.

Eingegangen am 3. Januar 2008,

veränderte Fassung am 2. März 2008

Online veröffentlicht am 5. Juni 2008

Stichwörter: Amyloide · Fibrillen · NMR-Spektroskopie · Proteinstrukturen · Strukturbioologie

- [1] F. Chiti, C. M. Dobson, *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 333.
- [2] C. M. Dobson, *Nature* **2003**, *426*, 884.
- [3] U. Baxa, T. Casse, A. V. Kajava, A. C. Steven, J. M. S. Andrey Kajava, A. D. P. David, *Advances in Protein Chemistry*, Vol. 73, Academic Press, **2006**, S. 125.
- [4] R. Morales, K. Abid, C. Soto, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2007**, *1772*, 681.
- [5] B. H. Toyama, M. J. S. Kelly, J. D. Gross, J. S. Weissman, *Nature* **2007**, *449*, 233.
- [6] A. K. Paravastu, A. T. Petkova, R. Tycko, *Biophys. J.* **2006**, *90*, 4618.
- [7] A. T. Petkova, R. D. Leapman, Z. Guo, W.-M. Yau, M. P. Mattson, R. Tycko, *Science* **2005**, *307*, 262.
- [8] P. C. A. van der Wel, J. R. Lewandowski, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5117.
- [9] O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, J. J. Balbach, R. Tycko, *Biochemistry* **2002**, *41*, 15436.

- [10] A. T. Petkova, G. Buntkowsky, F. Dyda, R. D. Leapman, W. M. Yau, R. Tycko, *J. Mol. Biol.* **2004**, *335*, 247.
- [11] R. A. Kammerer, D. Kostrewa, J. Zurdo, A. Detken, C. García-Echeverría, J. D. Green, S. A. Muller, B. H. Meier, F. K. Winkler, C. M. Dobson, M. O. Steinmetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 4435.
- [12] R. A. Kammerer, M. O. Steinmetz, *J. Struct. Biol.* **2006**, *155*, 146.
- [13] M. Sunde, L. C. Serpell, M. Bartlam, P. E. Fraser, M. B. Pepys, C. C. F. Blake, *J. Mol. Biol.* **1997**, *273*, 729.
- [14] M. O. Steinmetz, C. García-Echeverría, R. A. Kammerer, *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2005**, *11*, 43.
- [15] M. O. Steinmetz, Z. Gattin, R. Verel, B. Ciani, T. Stromer, J. M. Green, P. Tittmann, C. Schulze-Briese, H. Gross, W. F. van Gunsteren, B. H. Meier, L. C. Serpell, S. A. Muller, R. A. Kammerer, *J. Mol. Biol.* **2008**, *376*, 898.
- [16] T. Gullion, J. Schaefer, *J. Magn. Reson.* **1989**, *81*, 196.
- [17] T. Gullion, J. Schaefer, *Adv. Magn. Reson.* **1989**, *13*, 57.
- [18] Vollständige Details zur Datenanalyse: A. Detken, R. Verel, B. Bianchi, C. García-Echeverría, R. A. Kammerer, M. O. Steinmetz, B. H. Meier, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [19] M. R. Sawaya, S. Sambashivan, R. Nelson, M. I. Ivanova, S. A. Sievers, M. I. Apostol, M. J. Thompson, M. Balbirnie, J. J. W. Wiltzius, H. T. McFarlane, A. O. Madsen, C. Riek, D. Eisenberg, *Nature* **2007**, *447*, 453.
- [20] J. J. Balbach, Y. Ishii, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, N. W. Rizzo, F. Dyda, J. Reed, R. Tycko, *Biochemistry* **2000**, *39*, 13748.
- [21] R. Tycko, Y. Ishii, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6606.
- [22] T. Gullion, D. B. Baker, M. S. Conradi, *J. Magn. Reson.* **1990**, *89*, 479.
- [23] S. A. Smith, T. O. Levante, B. H. Meier, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1994**, *106*, 75.
- [24] P. Güntert, C. Mumenthaler, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1997**, *273*, 283.
- [25] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *J. Molec. Graphics* **1996**, *14*, 33.
- [26] Die Nomenklatur des Registers ist relativ zu einem „in-Register“-antiparallelen β -Faltblatt festgelegt. Das Vorzeichen gibt die Richtung an, in welcher der benachbarte β -Strang verschoben ist. Die Grundlage dafür bildet die Tatsache, dass die Summe der Positionsnummern zweier Reste, die in einem antiparallelen β -Faltblatt auf benachbarten β -Strängen liegen, konstant ist für ein beliebiges β -Faltblattregister. So ergibt das „in-Register“-antiparallele β -Faltblatt von $\text{c}\beta\beta$ eine Summe von 18 (Ser1 ist benachbart mit Gly17, Ile2 mit Ile16, etc.), das „+ 3-or“ ergibt eine Summe von $18 + 3 = 21$ (Ala7 ist benachbart mit Leu14), und das „-2-or“ ergibt eine Summe von $18 - 2 = 16$ (Ile2 ist benachbart mit Leu14). Dies indiziert zudem, welcher Aminosäurerest Wasserstoffbrücken bildet und welcher sich außerhalb dieser Region befindet. In „+ 3-or“ kann Ser1 demnach nicht benachbart sein, denn um eine Summe von 21 zu erreichen, wäre ein Aminosäurerest 20 nötig, der aber nicht existiert.