

pH-abhängige Dimerisierung und salzabhängige Stabilisierung der N-terminalen Domäne von Abseilfaden-Spinnenseide – Details zur Initiation des Assemblierungsprozesses**

Franz Hagn, Christopher Thamm, Thomas Scheibel und Horst Kessler*

Die Assemblierung von Abseilfaden („dragline“)-Spinnenseide wird durch die relativ kleinen C- und N-terminalen Domänen der Spidroine kontrolliert.^[1–6] Die außergewöhnlichen mechanischen Eigenschaften von Spinnenseide sind das Ergebnis einer streng kontrollierten Anlagerung von Polyalanin- und Poly(glycinalanin)-Wiederholungseinheiten (polyA bzw. polyGA), die sich in der Seidensequenz mit GGX- und GPGXX-Einheiten abwechseln, welche dem Faden die Elastizität verleihen.^[4,5,7] Die korrekte Assemblierung dieser polyA/polyGA-Sequenzen zu mikrokristallinen Strukturbereichen wird durch den pH-Wert, die Salzkonzentration und eine durch Scherkräfte induzierte partielle Entfaltung der dimeren C-terminalen Domäne kontrolliert.^[8] Der N-terminalen Domäne wurde ebenso eine wichtige Rolle für die Faserassemblierung in einer pH-abhängigen Weise zugeschrieben.^[9] Mithilfe von NMR-Spektroskopie und Lichtstreuungsmessungen zeigen wir hier, dass die N-terminale Domäne eines Seidenproteins aus der großen Spinn-drüse der Schwarzen Witwe (*Latrodectus hesperus*) im neutralen pH-Bereich – wie er in der Spinn-drüse vorkommt – hauptsächlich als Monomer vorliegt. Die leichte Tendenz zur Dimerisierung kann durch die natürliche Salzkonzentration inhibiert werden. Bei niedrigerem pH-Wert (wie für die Faserassemblierung nötig) bildet die N-terminale Domäne jedoch Dimere. Der für die Faserbildung sehr wichtige Assemblierungsprozess der N-terminalen Domäne wird also hauptsächlich durch eine Senkung des pH-Werts kontrolliert. Die Kristallstruktur der N-terminalen Domäne zeigt ein Homodimer mit einer antiparallelen Orientierung der beiden

Untereinheiten. Die hier gezeigten NMR-Daten ergänzen dieses Bild durch neue Erkenntnisse zur Regulation und Funktion dieser Domäne, die zur Bildung langer Seidenfäden nötig ist.

Spinnenseiden-Abseilfäden bestehen aus zwei Proteinen mit jeweils verschiedenen konservierten N-terminalen Domänen (SI-Abbildung 1 in den Hintergrundinformationen). Für unsere strukturelle Charakterisierung wurden die N-Termini der Seidenproteine aus der großen Spinn-drüse (major ampullate gland, MA) von *Latrodectus hesperus* verwendet (N1 und N2, SI-Tabelle 1). In Übereinstimmung mit einem früheren Bericht^[10] konnten wir mithilfe von Zirkulardichroismus(CD)-Spektroskopie zeigen, dass beide Konstrukte einen hohen α -Helix-Anteil und ausreichend hohe thermische Stabilität aufweisen (SI-Abbildung 2). N1 ist etwas stabiler als N2, weshalb dieses für eine NMR-spektroskopische Charakterisierung verwendet wurde.

Mit einem Satz von Tripelresonanz-Experimenten konnten die Proteinrückgrat-atome von 97% aller Aminosäurereste (128 von 132) und außerdem fast alle Proteinseiten-

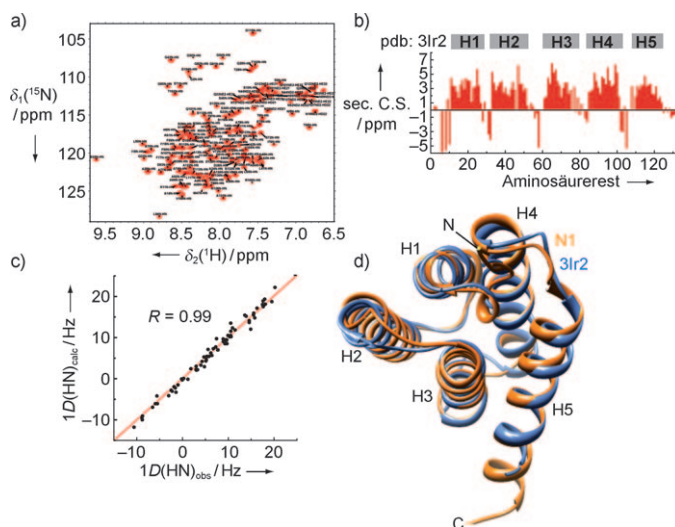


Abbildung 1. NMR-Analyse von N1. a) ^1H - ^{15}N -HSQC von N1 mit zugeordneten Resonanzen. b) Sekundäre chemische Verschiebungen von N1 weisen auf 5 α -Helices hin. c) Experimentelle HN-RDCs von N1 in 20 mg mL^{-1} Pf1-Phagen-Medium ($^1\text{D}(\text{HN})_{\text{obs}}$) aufgetragen gegen die mit der verfeinerten Struktur von N1 zurückgerechneten HN-RDCs ($^1\text{D}(\text{HN})_{\text{calc}}$). d) Die Strukturüberlagerung zwischen der N-terminalen Domäne von *Euprostenops australis* (pdb: 3Lr2, blau) und der verfeinerten Struktur von N1 (orange) zeigt eine quadratisch gemittelte Abweichung von 0.8 \AA für die Proteinrückgrat-atome. Sec.C.S.: sekundäre C^α , C^β -chemische Verschiebung ($\Delta\delta(^{13}\text{C}^\alpha) - \Delta\delta(^{13}\text{C}^\beta)$).

[*] Dr. F. Hagn, Prof. Dr. H. Kessler
Technische Universität München, Institute for Advanced Study and Center for Integrated Protein Science
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
Fax: (+49) 89-289-13210
E-Mail: horst.kessler@ch.tum.de
Homepage: <http://www.org.chemie.tu-muenchen.de>

C. Thamm, Prof. Dr. T. Scheibel
Universität Bayreuth, Lehrstuhl Biomaterialien
Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften
Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von CIPSM und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (an H.K.), dem Elitenetzwerk Bayern, Complt (an F.H.) und durch das BMBF (Fördernummer 13N9736; an T.S.) unterstützt. Wir danken Lukas Eisoldt für die Bereitstellung der Plasmide für N1 und N2 und Dr. Martin Humenik für technische Hilfe mit den SEC-MALS-Experimenten.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201003795> zu finden.

kettenatome zugeordnet werden (Abbildung 1a). Die Auswertung der chemischen Verschiebungen bestätigte das Vorkommen von fünf α -helikalen Sekundärstrukturelementen (Abbildung 1b). Mit einer kürzlich bestimmten dimeren Kristallstruktur einer N-terminalen Domäne des MA-Spidroins von *Euprosthenops australis* (PDB-Nummer: 3lr2^[9]) konnte ein Homologiemodell für das hier verwendete Protein erstellt werden. Die Lage der Sekundärstrukturelemente in diesem Modell stimmt sehr gut mit den chemischen Verschiebungen im NMR-Spektrum in Lösung überein (graue Kästen in Abbildung 1b). Nur die C-terminale Helix 5 ist in N1 um vier Reste länger als im Modell. Die Lage der gefalteten Bereiche im Protein konnte zusätzlich durch heteronucleare $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOE-Experimente bestätigt werden (SI-Abbildung 3), welche die Dynamik auf der ns- bis ps-Zeitskala erfassen.

Zur Verfeinerung des Strukturmodells von N1 wurde eine Kombination von auf chemischen Verschiebungsdaten basierenden Proteinrückgratwinkeln (erhalten mit TALOS^[11]), wenigen NOE-Daten (vor allem $\text{H}^{\text{N}}\text{-H}^{\text{N}}$ -Kontakte) und dipolaren HN -Restkopplungen (HN -RDCs) verwendet. Die experimentellen HN -RDCs stimmten sehr gut mit den unter Verwendung der verfeinerten Struktur von N1 zurückgerechneten Werten überein (Abbildung 1c), und diese Struktur zeigte eine quadratisch gemittelte Abweichung (rmsd) von 0.8 Å zur verwendeten Referenzstruktur (Abbildung 1d). Dies zeigt deutlich, dass die Strukturen der N-terminalen Domänen zwischen den verschiedenen Spinnenspezies konserviert sind.

Bei der Untersuchung der Auswirkungen von pH-Wert und Salzkonzentration auf die Struktur der N-terminalen Domäne wurden zuerst mithilfe von Fern-UV-CD-Spektroskopie Änderungen in der Sekundärstruktur erfasst. Wie in SI-Abbildung 4 gezeigt, konnten keine signifikanten Unterschiede im Spektrum nach Änderung des pH-Werts und der Salzkonzentration detektiert werden. Zusätzlich wurden Nah-UV-CD-Spektren von N1 (welche die Änderungen um Trp8 anzeigen) bei zwei verschiedenen pH-Werten und Salzkonzentrationen gemessen. Dies sollte Änderungen in der Tertiärstruktur anzeigen. Abbildung 2a zeigt die Unterschiede in den Spektren für pH 7.2 und pH 6.0: Bei pH 7.2, bei dem die Seidenproteine im Lumen der Spinndrüse gespeichert sind, bewirkt die Gegenwart von Salz keine signifikanten Änderungen im Spektrum. Bei pH 6 jedoch, vorherrschend bei der Faserassemblierung, hat Salz einen sehr deutlichen Effekt auf das Spektrum, was auf eine Tertiärstruktur-modulierende Rolle von Salz bei diesem pH-Wert hindeutet.

Die Stabilität der Sekundärstruktur von N1 ist bei der Faserassemblierung ($\text{pH} \approx 6$) höher als bei der Proteinspeicherung ($\text{pH} \approx 7.2$; Abbildung 2b), wenn man die Salzeffekte vernachlässigt. Diese Effekte werden höchstwahrscheinlich durch die Protonierung von Carboxylatgruppen von Glutamat- oder Aspartat-Seitenketten verursacht. Eine Stabilisierung kann man bei der Erhöhung der Salzkonzentration von 0 auf 800 mM bei pH 7.2 beobachten. Durch Einsatz hoher Salzkonzentrationen konnte der Schmelzpunkt um mehr als 20 °C erhöht werden (Abbildung 2c), und Experimente zur Harnstoff-induzierten Entfaltung deuten auf eine

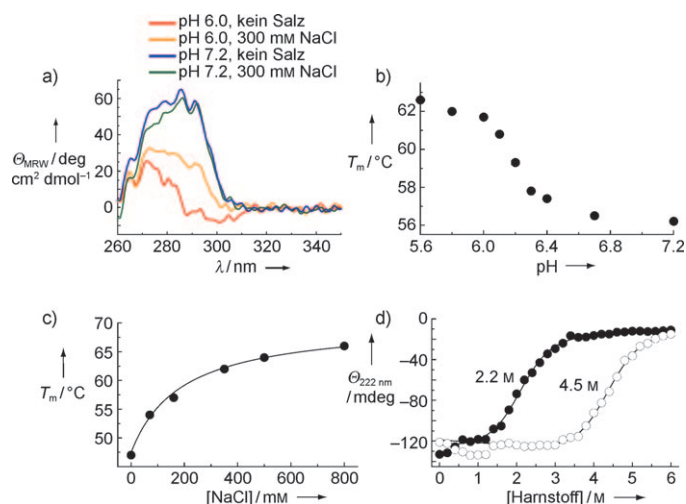


Abbildung 2. Effekt von pH-Wert und Salzkonzentration auf die Struktur und Stabilität von N1. a) Die Nah-UV-CD-Spektren von 100 µM N1 bei pH 6 und pH 7.2 zeigen signifikante Unterschiede. b) und c) Thermische Stabilität der Sekundärstruktur von N1 bei verschiedenen pH-Werten (100 mM NaCl) und steigender Natriumchlorid-Konzentration bei pH 7.2. d) Harnstoff-induzierte Entfaltung von N1 ohne Salz (●) und in Gegenwart von 500 mM Natriumchlorid (○).

mehr als doppelt so hohe Stabilität von N1 in Gegenwart von 500 mM NaCl hin (Abbildung 2d). Dieser Effekt von pH-Wert und Salzkonzentration auf die Stabilität von N1 scheint von der lokalen Nähe von gleichen Ladungen auf der Oberfläche verursacht zu sein und spiegelt die Destabilisierung der Proteine durch solche Cluster wider.^[12] In der Tat kommen solche Cluster von negativen und positiven Ladungen bei der N-terminalen Domäne vor (Abbildung 3a), die im dimeren Protein die Kontaktfläche der beiden Monomere bilden.

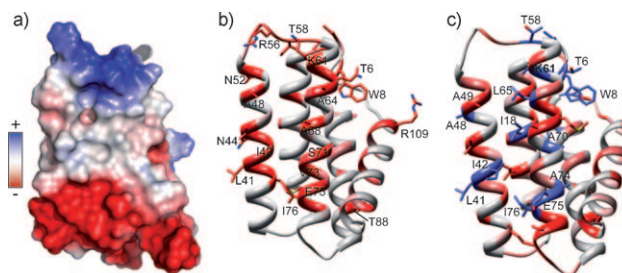


Abbildung 3. NMR-spektroskopische Charakterisierung der Effekte von pH-Wert und Salzkonzentration. a) Elektrostatisches Potential von N1. Auf der Proteinoberfläche befinden sich positiv und negativ geladene Cluster. b) Die Farbintensität in der Struktur entspricht den CSPs nach Zugabe von 300 mM NaCl. c) CSPs bei Änderung des pH-Werts von 7.2 auf 6.0. HN-Korrelationssignale von Resten in blau verschwinden bei der pH-Titration.

In „Chemical-shift-perturbation“ (CSP)-NMR-Experimenten (SI-Abbildung 5) wurde der Effekt von Salzkonzentration und pH-Wert auf N1 untersucht. Die Zugabe von Salz führt zu starken chemischen Verschiebungsdifferenzen im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum, die vor allem an der Dimerisierungsstelle ausgeprägt sind (Abbildung 3b). Die gleiche Region ist bei einer Senkung des pH-Werts von 7.2 auf 6.0 betroffen.

Bei pH 6 sind noch zusätzlich viele Resonanzen stark verbreitert, was sehr wahrscheinlich auf einen chemischen Austauschprozess auf der ms- bis μ s-Zeitskala, verursacht durch das Monomer-Dimer-Gleichgewicht, zurückzuführen ist (Abbildung 3c). Ebenso konnten chemische Verschiebungsdifferenzen in N1 bei einer Erhöhung der Proteinkonzentration beobachtet werden, die wiederum genau diejenigen Reste betrafen, die in der Kristallstruktur^[9] an der Dimerisierungsstelle lagen (Abbildung 4a). Die Linienbreiten

funktionelle Relevanz.^[13] Es ist daher nicht außergewöhnlich, dass eine solche Region die Proteindimerisierung im Fall von N1 vermittelt.

Zusammen mit unseren Ergebnissen zur C-terminalen Domäne^[8] ergeben publizierte Daten zur N-terminalen Domäne des MA-Spidroins^[9] von *E. australis* und die hier gezeigten Daten zum N-Terminus von *L. hesperus* ein detailliertes molekulares Bild vom Initiationsprozess der Assemblierung des Spinnenseiden-Abseilfadens (Abbildung 5).

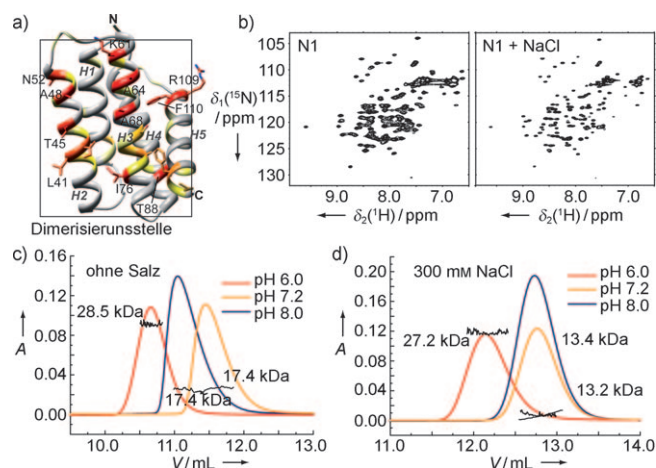


Abbildung 4. Monomer-Dimer-Analyse von N1. a) CSPs von N1 bei steigenden Proteinkonzentrationen. b) Die Linienbreiten im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von 400 μM N1 bei pH 7.2 mit 300 mM NaCl und ohne Salz verdeutlichen, dass sich durch die Salzzugabe das Gleichgewicht zum Monomer verschiebt. c,d) Gelfiltrationschromatogramme von N1 bei verschiedenen pH-Werten c) ohne und d) mit Salz einschließlich der mit MALS berechneten Molekulargewichte.

im ^1H - ^{15}N -HSQC-Experiment sind in Gegenwart von Natriumchlorid signifikant geringer (Abbildung 4b), was auf eine Stabilisierung des N1-Monomers bei pH 7.2 durch Salz hindeutet.

Um diese Frage näher zu untersuchen, wurden Gelfiltrationsexperimente bei pH 8.0, 7.2 und 6.0 jeweils mit und ohne Salz durchgeführt. Bei pH 6.0 bildet N1 unabhängig von der Salzkonzentration ein stabiles Dimer, im neutralen pH-Bereich jedoch führt Salz zu einer deutlichen Stabilisierung des Monomers. Ohne Salz zeigt sich eine leichte Tendenz zur Dimerisierung, was an dem asymmetrischen Elutionsprofil und dem leicht erhöhten detektierten Molekulargewicht zu erkennen ist (MW des Monomers: 13.7 kDa; Abbildung 4c,d).

Mit NMR-Diffusionsmessungen bei pH 7.2 wurde nach Änderung der Natriumchlorid-Konzentration von 0 auf 300 mM ein um 16 % erhöhter Diffusionskoeffizient erhalten (SI-Abbildung 6), was die Annahme eines verschobenen Monomer-Dimer-Gleichgewichts stützt. Die geladenen Cluster auf der Oberfläche von N1 ermöglichen eine antiparallele Dimerisierung, bewirken aber, dass dieser Zustand empfindlich gegenüber Salz und dem pH-Wert ist. Stark geladene Oberflächenregionen sind seit langem bekannt für

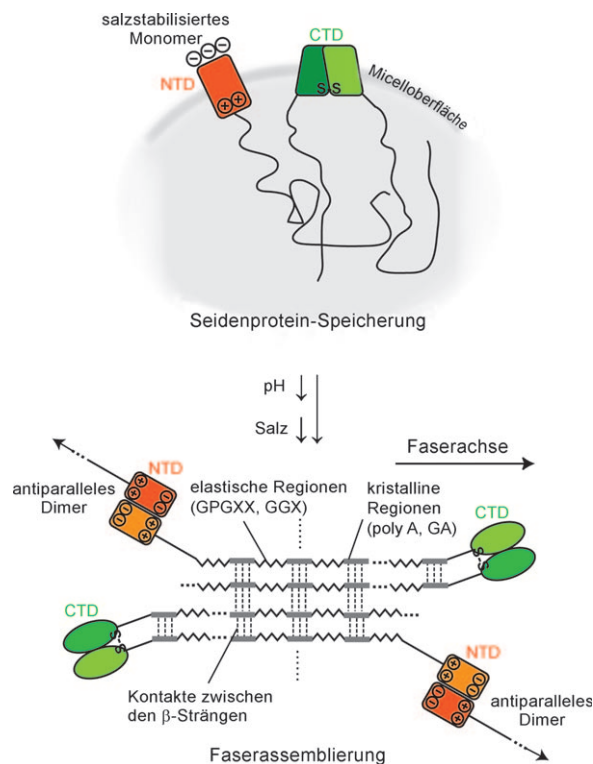


Abbildung 5. Mechanismus der Initiation des Faserassemblierungsprozesses und die pH- und Salz-abhängige Rolle der N-terminalen Domäne von Spinnenseide-Abseilfäden. Während der Lagerung der Seidenproteine in sehr hohen Konzentrationen liegen sowohl die N- als auch die C-terminale Domäne (NTD bzw. CTD) auf der Oberfläche von Proteinmicellen. Faserbildungsbedingungen (niedriger pH-Wert, wenig Salz) ermöglichen die Dimerisierung der N-terminalen Domänen. Die durch die repetitiven polyA/GA-Elemente^[17] gebildeten mikrokristallinen Regionen (graue Rechtecke) vermitteln die weitere nichtkovalente Wechselwirkung zwischen den Ketten (gestrichelte Linien). Gepunktete Linien deuten an, dass die repetitiven Elemente viel länger sind als im Bild gezeigt. Dieses Modell gibt nicht die tatsächlichen Größenverhältnisse der kristallinen Regionen wieder, und die Position der Termini ist willkürlich gewählt.

Während der Speicherung in der Spinndrüse bei hohen Proteinkonzentrationen, in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen und im neutralen pH-Bereich,^[14] bilden die Spinnenseidenproteine supramolekulare Micellen^[3,5,8,15] – eine sehr effiziente Form der Lagerung bei Proteinkonzentrationen bis 40 % (w/v) – in denen die N-terminale Domäne höchstwahrscheinlich als durch Salz stabilisiertes Monomer vorkommt, was durch die NMR-Daten bei hohen Proteinkonzentrationen

nen nahegelegt wird (Abbildung 4b). Beim Durchgang durch den Spinntrichter werden die NaCl-Konzentration^[14,16] und der pH-Wert gesenkt, und Scherkräfte induzieren eine Ausrichtung der Proteinketten parallel zur Längsachse der Faser.^[5,17] Dafür stellt die C-terminale Domäne das korrekte Register der repetitiven Elemente bereit.^[8] Sowohl die polyA- als auch die polyGA-Blöcke können Mikrokristallite bilden, die aus β -Strängen bestehen.^[17] Die Funktion der N-terminalen Domäne im Initiationsprozess der Faserassemblierung ist die Salz- und pH-Wert-abhängige Wechselwirkung dieser bereits bestehenden supramolekularen Strukturen, was durch die Dimerisierung mit weiteren N-Termini erreicht wird. Die N-Termini bilden dabei antiparallele Dimere,^[9] was im Einklang mit den hier gezeigten Daten und den Oberflächenladungen von N1 ist (Abbildung 3a). Zusammen mit den kristallinen Bereichen, die aus den repetitiven Elementen bestehen, ermöglicht die solvensabhängige multivalente Verankerung^[18] der N-terminalen Domänen eine kontrollierte Wechselwirkung zwischen den Proteinketten und deren Verlängerung.

Zusammengefasst ist nun ein Modell für den Mechanismus der Initiation der Spinnfaserassemblierung ersichtlich. Die Speicherung von Spinnenseidenproteinen bei hohen Konzentrationen in wässriger Lösung (wie etwa in der Spinnrüse) ist in Micellen möglich, in denen sich die gefalteten polaren Enden (N- und C-terminale Domänen) an der Oberfläche und die repetitiven Elemente im Inneren der Micelle befinden. Beim Durchgang durch den Spinntrichter führen Scherkräfte zu einer Ausrichtung der Ketten. Änderungen sowohl in der Konzentration als auch in der Zusammensetzung von Salzen destabilisieren die C-terminale Domäne und ermöglichen die Ausrichtung der repetitiven Elemente, was zur Initiation von β -Faltblatt-reichen Strukturen führt, die möglicherweise einen Keim zur Bildung der fertigen Faserstruktur darstellen. Zusätzlich führt die pH-Wert-Senkung zur antiparallelen Dimerisierung der N-terminalen Domänen. So ermöglicht die Gegenwart der beiden terminalen Domänen in einem Spinnenseidenprotein die Assemblierung dieser Proteine zu einer endlosen stabilen Faser. Es kommt daher auf eine genaue Balance der Solvensbedingungen an, die neben den Scherkräften einen wichtigen Schritt zur Initiation des Faserassemblierungsprozesses von Spinnenseidenproteinen darstellt.

Experimentelles

Die Gene für die N-terminalen Domänen der MA-Spidroine 1 und 2 von *Latrodectus hesperus* (N1 und N2, ohne die Signalsequenz) wurden chemisch synthetisiert (GeneArt, Regensburg, Deutschland), in einen pET28a-Expressionsvektor (Novagen) kloniert und im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) bei 20 °C für 16 h exprimiert. Zum Markieren mit NMR-aktiven Isotopen wurden jeweils 1 g [¹⁵N]Ammoniumchlorid und 2 g [¹³C]Glucose pro Liter M9-Medium verwendet. Die Proteine wurden durch Nickel-NTA-Chromatographie und Gelfiltrationschromatographie aufgereinigt.

CD-Experimente wurden an einem J-715-Spektropolarimeter (Jasco, Gross-Umstadt, Deutschland) durchgeführt. Für Fern-UV-Spektren und thermische Übergänge (bei 10 μ M Proteinkonzentration) wurde eine Küvette mit 0.1 cm, für Harnstoff-induzierte Entfaltungen (bei 2 μ M Proteinkonzentration) eine Küvette mit 1 cm

Schichtdicke verwendet. Nah-UV-CD-Spektren wurden bei 100 μ M Proteinkonzentration und mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Response wurde auf 2 s und die Bandbreite auf 5 nm gesetzt.

Thermische CD-Übergänge wurden bei einer Wellenlänge von 222 nm und einer Heizgeschwindigkeit von 60 °C h⁻¹ gemessen. Chemische Entfaltung wurde durch die Zugabe von Harnstoff bis zu einer Konzentration von 6 M erreicht. Proteinproben (2 μ M) wurden bei 4 °C über Nacht inkubiert, und anschließend wurde das CD-Signal bei 222 nm gemessen. Die erhaltenen Daten wurden mithilfe eines Zwei-Zustands-Faltungsmodells ausgewertet.^[19]

Gelfiltrationschromatographie wurde mit einem Agilent-1100-System und einer Superdex-75-10/300-GL-Säule (GE Healthcare, München, Deutschland), UV-Detektion bei 280 nm und einer Flussgeschwindigkeit von 0.4 mL min⁻¹ durchgeführt. 100 μ L einer 1 mg mL⁻¹ Proteinlösung wurde jeweils nach Äquilibrierung der Säule mit dem verwendeten Puffer auf die Säule injiziert. Das Chromatographiesystem war verbunden mit einer Lichtstreuungseinheit (multi-angle light scattering (MALS) und quasi-elastic light scattering (QELS) bei 99°) und einem differentiellen Brechungsindexdetektor (Wyatt Technology Europe, Dernbach, Deutschland). QELS-Detektoren (Wyatt) und ein RI-Detektor (Shodex RI71, Techlab, Erkerode, Deutschland) wurden in Serie geschaltet. Die Datenaufzeichnung und Prozessierung erfolgte mit dem Wyatt-ASTRA-Programm (5.3.4.14).

Die NMR-spektroskopischen Experimente wurden an 600- und 900-MHz-Spektrometern (Bruker Biospin, Rheinstetten, Deutschland) durchgeführt. Die Zuordnung der Resonanzen wurde durch die Verwendung von konventionellen 3D-Heterokern-NMR-Experimenten^[20] und mit einer U-^{[13}C,¹⁵N]-markierte Probe von 800 μ M N1 (in 10 mM Natriumphosphat, pH 7.2, 300 mM NaCl) erreicht. Der Zuordnungsprozess wurde durch das Programm PASTA^[21] unterstützt. NOESY-Spektren wurden wie bereits beschrieben gemessen.^[8,22] HN-RDCs wurden mit IPAP-Experimenten^[23] gemessen (in 10 mM Natriumphosphat, pH 7.2, 300 mM NaCl), in denen das Protein-„Alignment“ durch die Zugabe von 20 mg mL⁻¹ Pf1-Phagen^[24] (Helios, Regensburg, Deutschland) induziert wurde. Für die Strukturrechnung und RDC-Verfeinerung wurde das Programm Xplor-NIH^[25] unter Verwendung von Standardskripten genutzt. Die heteronuclearen ¹H,¹⁵N-NOE-Experimente wurden mit 2 s Protonensättigungszeit (und gleichzeitig Relaxationszeit) aufgenommen. CSP-NMR-Experimente wurden anhand des gewichteten Mittels der ¹H- und ¹⁵N-chemischen Verschiebungsdifferenzen ausgewertet.^[26] Das ursprüngliche Homologiemodell wurde mit dem Programm Swiss-Model erstellt.^[27] „Stimulated-echo“-NMR-Diffusionsmessungen wurden mit 350 ms Diffusionszeit und zwei bipolaren Dephasierungsgradienten von 2 ms Länge gemessen. Jeweils 32 Datenpunkte wurden bei steigenden Gradientenstärken (0.7 bis 32.4 G cm⁻¹) aufgenommen. Die Zuordnung der NMR-Resonanzen ist in der BMRB-Datenbank unter dem Zugangscode 17131 hinterlegt.

Eingegangen am 21. Juni 2010,
veränderte Fassung am 20. August 2010
Online veröffentlicht am 9. November 2010

Stichwörter: Biopolymere · NMR-Spektroskopie · Proteinfaltung · Proteinstrukturen · Zirkulardichroismus

- [1] D. Motriuk-Smith, A. Smith, C. Y. Hayashi, R. V. Lewis, *Biopolymers* **2005**, 6, 3152.
- [2] A. Sponner, W. Vater, W. Rommerskirch, F. Vollrath, E. Unger, F. Grosse, K. Weissart, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 338, 897.
- [3] J. H. Exler, D. Hümmerich, T. Scheibel, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 3629; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 3559.
- [4] M. Heim, D. Keerl, T. Scheibel, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 3638; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 3584.

- [5] L. Eisoldt, J. G. Hardy, M. Heim, T. R. Scheibel, *J. Struct. Biol.* **2010**, *170*, 413.
- [6] S. Rammensee, U. Slotta, T. Scheibel, A. R. Bausch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 6590.
- [7] J. M. Gosline, P. A. Guerette, C. S. Ortlepp, K. N. Savage, *J. Exp. Biol.* **1999**, *202*, 3295.
- [8] F. Hagn, L. Eisoldt, J. G. Hardy, C. Vendrely, M. Coles, T. Scheibel, H. Kessler, *Nature* **2010**, *465*, 239.
- [9] G. Askarieh, M. Hedhammar, K. Nordling, A. Saenz, C. Casals, A. Rising, J. Johansson, S. D. Knight, *Nature* **2010**, *465*, 236.
- [10] A. Rising, G. Hjalm, W. Engstrom, J. Johansson, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 3120.
- [11] G. Cornilescu, F. Delaglio, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 289.
- [12] M. Akke, S. Forsen, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1990**, *8*, 23.
- [13] E. D. Getzoff, J. A. Tainer, P. K. Weiner, P. A. Kollman, J. S. Richardson, D. C. Richardson, *Nature* **1983**, *306*, 287.
- [14] E. K. Tillinghast, S. F. Chase, M. A. Townley, *J. Insect Physiol.* **1984**, *30*, 591.
- [15] Z. Lin, W. Huang, J. Zhang, J. S. Fan, D. Yang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 8906.
- [16] D. P. Knight, F. Vollrath, *Naturwissenschaften* **2001**, *88*, 179.
- [17] J. D. van Beek, S. Hess, F. Vollrath, B. H. Meier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 10266.
- [18] M. Mammen, S. K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754.
- [19] P. L. Privalov, *Adv. Protein Chem.* **1979**, *33*, 167.
- [20] M. Sattler, J. Schleucher, C. Griesinger, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, *34*, 93.
- [21] M. Leutner, R. M. Gschwind, J. Liermann, C. Schwarz, G. Gemmecker, H. Kessler, *J. Biomol. NMR* **1998**, *11*, 31.
- [22] T. Diercks, M. Coles, H. Kessler, *J. Biomol. NMR* **1999**, *15*, 177.
- [23] M. Ottiger, F. Delaglio, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1998**, *131*, 373.
- [24] M. R. Hansen, L. Mueller, A. Pardi, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 1065.
- [25] C. D. Schwieters, J. J. Kuszewski, N. Tjandra, G. M. Clore, *J. Magn. Reson.* **2003**, *160*, 65.
- [26] F. Hagn, C. Klein, O. Demmer, N. Marchenko, A. Vaseva, U. M. Moll, H. Kessler, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 3439.
- [27] N. Guex, M. C. Peitsch, *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2714.