

Die Amyloid-Kongorot-Bindungsstelle in atomarer Auflösung**

Anne K. Schütz, Alice Soragni, Simone Hornemann, Adriano Aguzzi, Matthias Ernst, Anja Böckmann* und Beat H. Meier*

Amyloide sind β -Faltblatt-reiche Proteinaggregate, die pathologisches Kennzeichen einer Reihe menschlicher Krankheiten sind.^[1] Sie vervielfältigen sich durch Animpfen mit Fibrillensamen, verbreiten sich als Prionen, und können möglicherweise wichtige physiologische Aufgaben übernehmen.^[2] Amyloide sind universell dadurch definiert, dass sie mit Kongorot färbbar sind und dann grüne Doppelbrechung zeigen.^[3] Dennoch sind der Bindungsmechanismus, die Geometrie und die Feinstruktur des Amyloid-Kongorot-Komplexes erstaunlicherweise noch immer unbekannt. Mithilfe der Festkörper-NMR-Spektroskopie haben wir die Bindungsstelle zwischen Kongorot und Amyloidfibrillen der Prionen-Domäne des Pilzproteins HET-s^[4] charakterisiert. Der Farbstoff bindet sehr spezifisch und wechselwirkt mit Aminosäureresten, die eine Furche in der Nähe eines β -Bogens ausbilden. Die dreidimensionale Struktur der Fibrille bleibt erhalten. Erstaunlicherweise kann eine einzige Punktmutation, die aufgrund der Information über den Bindungsmodus erstellt wurde, ein künstliches Amyloid erzeugen, welches strukturell identisch zum Wildtyp, aber nicht durch Kongorot färbbar ist. Die benutzten Methoden erfordern keine Isotopenmarkierung des Kleinmoleküls und können generell angewendet werden, um die Wechselwirkung einer Vielzahl von Farbstoffen, Medikamenten und Markierungstoffen mit Amyloiden oder unlöslichen Proteinen zu charakterisieren.

Kongorot (Abbildung S1 der Hintergrundinformationen) ist ein Kleinmolekül, das spezifisch mit Amyloiden reagiert und seit den 1920er Jahren^[5] als analytischer Goldstandard für den Nachweis und die Charakterisierung von Amyloiden

benutzt wird.^[6] Trotz seiner hohen Bindungsspezifität und seiner anti-amyloidogenen Eigenschaften haben die hohe Toxizität und die schlechten pharmazeutischen Eigenschaften von Kongorot seinen Gebrauch als molekularen Amyloid-Indikator in vivo^[7] und als Medikament gegen Amyloidablagerungen verhindert.^[8] Obwohl widersprüchliche Berichte existieren über die Art der Wechselwirkung zwischen Kongorot und Amyloidfibrillen, sind folgende Tatsachen allgemein anerkannt: Kongorot bindet in etwa stöchiometrisch,^[6d,9] und die gebundene Form zeigt eine charakteristische Rotverschiebung im Absorptionsmaximum sowie Dichroismus und Doppelbrechung.^[6a,10] Es wird vermutet, dass die negativ geladenen Sulfatgruppen entscheidend sind für die Bindung an zwei Stellen am Protein, die etwa 20 Å Abstand voneinander aufweisen.^[11] Mangels Strukturinformation auf atomarer Ebene ist die Bindungsweise aber noch umstritten. Es wurde vermutet, dass die Längsachse des Moleküls parallel oder vertikal zur Fibrillenachse orientiert sein könnte und dass Kongorot als Monomer, Oligomer oder als Micelle^[6c,d] bindet oder sich zwischen die β -Faltblätter einlagern könnte.^[6c,12] Hypothesen sind, dass Wasserstoffbrücken, hydrophobe, aromatische und ionische Wechselwirkungen zur Bindung von Kongorot an Amyloide beitragen.^[6d] Auch die Seitenketten anderer Aminosäuren wie Histidin,^[13] Arginin^[13b] und Lysin^[9] könnten Kongophilie zu fördern.

Amyloidstrukturen mit atomarer Auflösung sind erst in letzter Zeit zugänglich geworden und ermöglichen nun detaillierte Untersuchungen des Wechselspiels dieser Proteinklasse mit ihren Bindungspartnern. HET-s(218–289), die prionenbildende Domäne des HET-s-Proteins des Fadenpilzes *Podospora anserina*, ist zurzeit eines der strukturell am besten definierten Amyloide.^[4b]

Um mittels NMR-Spektroskopie diejenigen Teile der Proteinoberfläche zu identifizieren, die mit Bindungspartnern wechselwirken, haben wir zunächst kleine Änderungen der chemischen Verschiebung (chemical-shift perturbations, CSP)^[14] untersucht, indem wir zweidimensionale ^{13}C - ^{13}C -Korrelationspektren (protonengetriebene Spindiffusion/proton-driven spin diffusion, PDS) von gefärbten und ungefärbten uniform [^{13}C , ^{15}N]-markierten Fibrillen verglichen haben. Da CSPs allosterisch sein können, haben wir auch Polarisationstransfer(PT)-Experimente durchgeführt, die direkt die räumliche Nähe zwischen Ligand und Protein nachweisen, indem sie die ausgeprägte Distanzabhängigkeit (r^{-3}) der Dipolwechselwirkung ausnutzen. Literaturbekannte PT-Methoden^[15] waren für unser System nur schwer umzusetzen, da sie isotopenmarkiertes Kongorot erfordern. Wir haben daher eine Methode entwickelt, die auf dem Transfer zwischen ^1H -Protonen des Liganden und ^{13}C -Kohlenstoff-

[*] A. K. Schütz, A. Soragni, Dr. M. Ernst, Prof. B. H. Meier
Physikalische Chemie, ETH Zürich, 8093 Zürich (Schweiz)
E-Mail: beme@ethz.ch

Dr. S. Hornemann, Prof. A. Aguzzi
Institut für Neuropathologie, Universitäts-Spital Zürich
Schmelzbergstrasse, 8091 Zürich (Schweiz)

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.boeckmann@ibcp.fr

[**] Diese Arbeit wurde durch die ETH Zürich, den Schweizerischen Nationalfonds (Grant 200020_124611), die CNRS und die Agence Nationale de la Recherche (ANR-07-PCVI-0013-03, ANR-06-BLAN-0266, ANR-PCV08 321323 und ANR08-PCVI-0022-02) unterstützt. Wir danken ebenfalls für Unterstützung durch die Europäische Kommission über das Siebte Rahmenprogramm (RP7), Kontrakt Bio-NMR 261863.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201008276> zu finden.

atomen des Proteins basiert und standardmäßig zugängliches [^2H , ^{13}C , ^{15}N]-isotopenmarkiertes Protein erfordert, jedoch keine Isotopenmarkierung des Liganden. In solchen Proben sind die Protonen des Kongorots die einzige Polarisationsquelle in ^1H - ^{13}C -PT-Experimenten. Die detektierten ^{13}C -Signale identifizieren Aminosäurereste in räumlicher Nähe zum Kongorot ($<4\text{ Å}$). Zwecks besserer spektraler Auflösung werden die Kohlenstoffatome in einem zweidimensionalen Korrelationsspektrum detektiert (dipolare Wiederkopplung unterstützt durch Amplitudenmodulation/dipolar recoupling enhanced by amplitude modulation, DREAM).

Die zentralen Ergebnisse der NMR-Experimente sind in Abbildung 1 zusammengefasst; Details sind außerdem in den

Abbildungen S2–S4 der Hintergrundinformationen verfügbar. Wichtige Bereiche der Differenzspektren des Polarisationstransfers sind in Abbildung 1 in der linken Spalte als rote Konturlinien gezeigt. Dort sind die wenigen, aber starken PT-Kreuzsignale überlagert mit den PDS-Referenzspektren der ungefärbten Fibrillen (in Schwarz). Starker Polarisationstransfer ist nachweisbar von Kongorot zu den Aminosäureresten S227, A228, K229, S263 und E265. Keine anderen Reste erhalten Polarisationstransfer vom Kongorot, wie das vollständige Spektrum in Abbildung S4 in den Hintergrundinformationen zeigt. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung hochspezifisch ist.

Die CSPs für dieselben spektralen Bereiche sind auf der rechten Spalte von Abbildung 1 gezeigt. Zunächst muss betont werden, dass die meisten CSPs zwischen den gefärbten Fibrillen (grüne Konturlinien) und der Kontrollprobe (schwarze Konturlinien) klein sind,^[16] was darauf hindeutet, dass die Struktur des Amyloids sich bei Bindung des Liganden nicht wesentlich verändert. Trotzdem beobachten wir einige bemerkenswerte CSPs und Linienverbreiterungen für fast alle Aminosäurereste mit PT, d. h. für K229 C δ -C ϵ (Abbildung 1 a, rechts), E265 C β -C α (Abbildung 1 b) und S227/S263 C α -C β (Abbildung 1 c) und auch für den benachbarten Rest V264 (Abbildung 1 e). Drei weitere CSPs außerhalb des hydrophoben Kerns werden für A248, A249 und V245 beobachtet (Abbildung S2), welche wir auf weitere Bindungsstellen zurückführen, die aber nicht relevant sind für die Kongorot-Doppelbrechung (siehe unten). Da andere Ser- und Thr-C α -C β -Korrelationen in den Spektren von Kongorot-gebundenen und freien Fibrillen identische Resonanzfrequenzen aufweisen, können Temperatur- und pH-Effekte ausgeschlossen werden.

Die Kerne, die CSP oder PT nach Binden des Kongorot zeigen, sind in Abbildung 2 auf der HET-s(218–289)-Struktur hervorgehoben.^[4b] Die Aminosäurereste treten gehäuft in der Nähe eines aus zwei Resten bestehenden Bogens auf, der β -Faltblätter $\beta 1\text{a}/\beta 1\text{b}$ und $\beta 3\text{a}/\beta 3\text{b}$ verbindet.^[4b] Die Reste S227, K229, S263 und E265 sind an der Proteinoberfläche exponiert. Wir können die Einlagerung von Kongorot zwischen die Windungen des β -Solenoids ausschließen, da solch eine Geometrie zu kürzeren Kontakten als 4 Å zwischen Protonen des Kongorots und fast allen Resten des hydrophoben Kerns führen würde, die dann als Kreuzsignale im PT Spektrum sichtbar sein müssten. Die experimentellen Befunde sind nur mit einer Geometrie vereinbar, in welcher das Kongorot mit seiner Längsachse parallel zur Fibrillenachse ausgerichtet ist. Der Abstand zwischen K229 der Proteinmonomere i und $i+2$ ist im Durchschnitt 19 Å , ähnlich dem 20 Å Abstand der beiden Sulfatgruppen im Kongorot. Es ist bemerkenswert, dass für andere Lysine im Protein (K218, K270, K284, von denen sich K270 auch in einem β -Faltblatt befindet) weder CSP noch PT auftreten. Dieses deutet nicht nur darauf hin, dass die Wechselwirkung sehr spezifisch ist, sondern schließt auch die geometrisch mögliche Verankerung von Kongorot mit seiner Längsachse senkrecht zur Fibrillenachse aus, z. B. durch Interaktion der zwei Sulfonatgruppen mit K229 und K270 zweier benachbarter β -Faltblätter.

Die Daten von CSP- und PT-Experimenten können in Abstandsbeschränkungen („distance restraints“) übersetzt

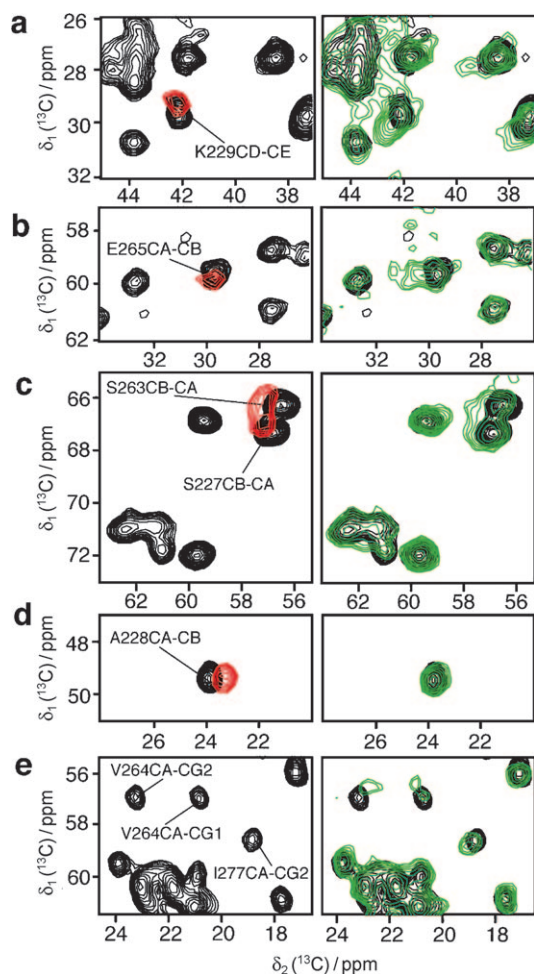


Abbildung 1. Die linke Spalte zeigt DREAM-PT-Spektren von perdeutierten und an Kongorot gebundenen HET-s(218–289)-Fibrillen in roten Konturlinien. Die PDS-Spektren einer Referenzprobe aus uniform markierten unbehandelten Fibrillen sind schwarz gezeichnet. Die grünen Konturlinien in der rechten Spalte gehören zum entsprechenden PDS-Spektrum der an Kongorot gebundenen Fibrillen. Unterschiede zwischen den schwarzen und grünen Spektren stellen CSPs dar. Relevante Kreuzsignale, die auch im Text diskutiert werden, sind beschriftet. Das PT-Spektrum ist ein Differenzspektrum, um Hintergrundsignale aufgrund nicht perfekter Deuterierung zu kompensieren (vgl. Hintergrundinformationen). Die vollständigen Spektren sind in den Abbildungen S2 und S4 gegeben, experimentelle Parameter in Tabelle S2. Die Kreuzsignale auf der anderen Seite der Diagonalen sind in Abbildung S6 gezeigt.

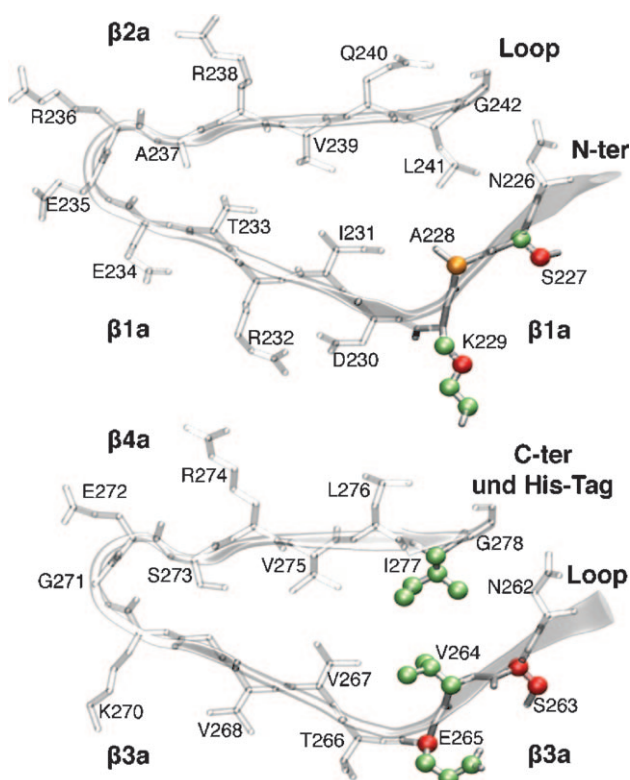


Abbildung 2. Graphische Zusammenfassung der NMR-Daten zur Bindung von Kongorot auf dem hydrophoben Kern des HET-s(218–289)-Amyloids (PDB-Code 2RNM). Rote Kugeln kennzeichnen Kerne mit signifikanten CSP-Effekten und PT vom Liganden, orange Kugeln Kerne nur mit PT, grüne Kugeln Kerne nur mit CSP.

werden und als Grundlage für Andockrechnungen („docking“) benutzt werden (Liste aller Abstände in Tabelle S1). Unter Einsatz des Programms HADDOCK,^[17] mit halbflexiblen Seitenketten und einem vollständig konformativ flexiblen Liganden, fanden wir die Geometrie, die in Abbildung 3 gegeben ist. (PDB-Code: 2LBU). Das Kongorotmolekül ist eingebettet in eine Furche, deren Unterseite durch die Oberfläche der β -Faltblätter 1a und 3a gebildet wird und deren Flanken von K229/E265 auf der einen Seite und S227/S263 auf der anderen Seite gebildet werden. Der Farbstoff ist mit der Längsachse parallel zur Fibrillenachse orientiert, und die Molekülebene steht radial zum Fibrillenkern. Die negativen Ladungen der Sulfatgruppen des Liganden zeigen von der Fibrillenoberfläche weg und sind in Kontakt (ca. 2.6 Å) mit zwei K229- ϵ -Aminogruppen (Abbildung 3). Das Kongorotmolekül hat also einen zweifachen elektrostatischen Anker, jeweils zu den i - und $(i+2)$ -HET-s(218–289)-Monomeren. Die Aminogruppen des Kongorot zeigen in Richtung der HET-s(218–289)-Oberfläche und bilden Wasserstoffbrücken mit zugänglichen Carbonylgruppen des Proteinrückgrats, darunter S227, A228, S263 und V264, für verschiedene Strukturen des HADDOCK-Ensembles (Abbildung 3c, Tabelle S3). Das Modell des gebundenen Komplexes, welches man aus HADDOCK erhält, ist vorteilhaft in Bezug auf Van-der-Waals-Wechselwirkungen (-44 ± 2 kcal mol⁻¹), elektrostatische Interaktion (-166 ± 13 kcal mol⁻¹) und Wasserstoffbrücken zwischen den funktionellen Gruppen des Li-

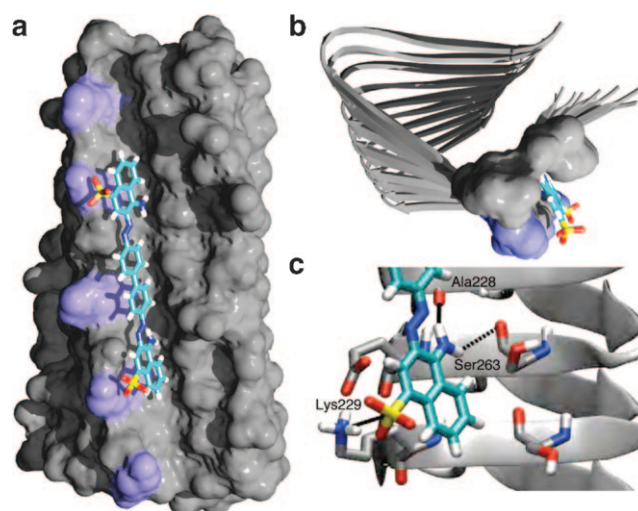


Abbildung 3. Struktur des Kongorot-HET-s(218–289)-Komplexes. a) Seitenansicht von Kongorot, gebunden an das HET-s(218–289)-Amyloid. Die entscheidende Aminosäure für die Bindung, K229, ist violett hervorgehoben. b) Ansicht von oben, die zeigt, wie Kongorot die ausgeprägte Furche besetzt, die von K229/E265 und S227/S263 gebildet wird (als Oberflächendarstellung). Der Rest des Amyloid-Kerns ist gemäß der β -Faltblatt-Sekundärstruktur als Streifen dargestellt. c) Wasserstoffbrücken vom Kongorot zum Proteinrückgrat und der elektrostatische Anker zu K229.

ganden und der Fibrillenoberfläche. Der Torsionswinkel der Biphenylbindung in Kongorot wird in der Literatur als ca. 40° im Gaszustand und 20–30° in Lösung angegeben.^[18] In unserem Bindungsmodell wird dieser Winkel einheitlich als fast planar bestimmt ($5 \pm 3^\circ$ in den zehn energetisch vorteilhaftesten HADDOCK-Strukturen), was die Rotverschiebung des Absorptionsmaximums bei Bindung an die Fibrille erklären kann.^[6d] Wenn jede Bindungsstelle in diesem Modell besetzt wäre, so wäre die Stöchiometrie des Komplexes ein Kongorotmolekül pro drei Fibrillenmonomere (vgl. Hintergrundinformationen).

Zusammenfassend zeigen unsere experimentellen Befunde, dass die Bindungsstelle von Kongorot an HET-s(218–289)-Fibrillen sehr genau definiert und spezifisch ist, und zwar entlang einer Furche, die parallel zur Fibrillenachse verläuft (Abbildung 3). Die Bindungsstelle ist charakterisiert durch die Wiederholung positiv geladener Aminosäurereste (hier Lysin) mit einem Abstand von 9.5 Å, der durch den Abstand der β -Faltblätter gegeben ist. Die beobachtete Bindungsstelle unterscheidet sich von anderen möglichen Bindungsstellen – darunter einer weiteren Lysin-Leiter mit denselben Abständen – durch die Existenz einer ausgeprägten Furche parallel zur Fibrillenachse, welche die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zum Proteinrückgrat ermöglicht. (Abbildung 3c). Der andere Lysinrest, K270, weist ein wesentlich weniger zugängliches Proteinrückgrat auf.

Diese Beobachtungen führen zu der verifizierbaren Hypothese, dass eine Punktmutation bei K229 die Kongorotfärbung deutlich beeinträchtigen sollte. Tatsächlich zeigt das Wildtyp-Protein nach der Bindung von Kongorot ausgeprägte Doppelbrechung, während die Färbung für die K229A-Mutante schwach und die Doppelbrechung praktisch nicht fest-

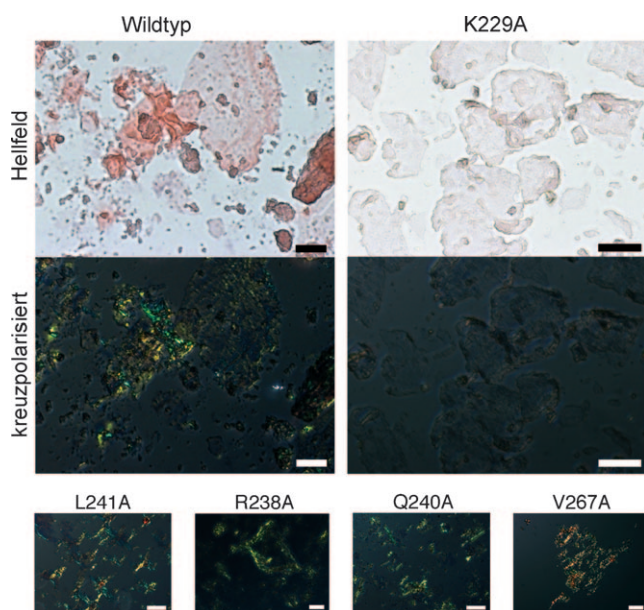


Abbildung 4. Vergleich der Kongorotfärbung für die verschiedenen Fibrillen. Wildtyp-HET-s(218–289) wird durch Kongorot gefärbt und zeigt grüne Doppelbrechung unter polarisiertem Licht. Die K229A-Mutante wird nur schwach gefärbt und zeigt keine Doppelbrechung, im Unterschied zu den Mutanten L241A, R238A, Q240A und V267A. Alle Maßstäbe sind 100 μm .

stellbar ist (Abbildung 4). Die NMR-Spektren (Abbildung S5) zeigen deutlich, dass die Struktur der Fibrille praktisch identisch ist für die Mutante, wie durch die nahezu unveränderten chemischen Verschiebungen bewiesen wird. Es gibt hingegen keine CSPs mehr, was die Ergebnisse der Lichtmikroskopie bestätigt. Andere Mutanten, die im Elektronenmikrograph sichtbare Amyloid-Fibrillen bilden, wurden ebenfalls getestet, nämlich Q240A, L241A, R238A und V267A, und im Unterschied zu K229A ist bei ihnen die Doppelbrechung nicht beeinträchtigt (Abbildung 4). Da die K229A-Mutation die Struktur der Amyloid-Fibrillen nicht verändert hat, weist die Abwesenheit von Kongophilie in der Fibrillen-bildenden HET-s(218–289)-Lysin-Punktmutante auf ein bemerkenswertes falsch-negatives Ergebnis der Kongorotfärbung hin: Die K229A-Mutante bildet ein Amyloid und zeigt keine Doppelbrechung. Die schwächeren Bindungsstellen bei A248, A249 und V245, die auch in der Mutante noch besetzt sind, sind nicht wichtig für die Doppelbrechung.

Kongophilie ist immer noch ein diagnostischer Goldstandard für die Identifikation von Amyloidablagerungen bei Säugetieren, und viele Amyloide, die mit Krankheiten assoziiert werden, testen positiv. Leitern von lösungsmittel-exponierten positiv geladenen Seitenketten, eine notwendige, aber nicht hinreichende Bedingung für Kongophilie von HET-s(218–289), existieren z.B. auch in veröffentlichten Strukturmodellen von $\text{A}\beta$.^[19] Die Gegenwart weiterer charakteristischer Merkmale, die hier identifiziert wurden, nämlich eine Furche an der Oberfläche und die Möglichkeit zur Bildung von Wasserstoffbrücken, ist für andere Amyloide unklar, da keine Strukturmodelle mit atomarer Auflösung verfügbar sind. Interessanterweise zeigt bovine spongiforme Enzepha-

lopathie (BSE) typischerweise keine kongophilen Aggregate bei Kühen, während die Aggregate kongophil werden bei der Übertragung auf Mäuse^[20] und bei den Fällen von BSE die als „bovine amyloidotic spongiforme Enzephalopathie (BASE)“^[21] herausgestellt wurden. Diese Klassifikation verlangt eine kritische Überprüfung angesichts unseres Befundes, dass die Kongophilie des Het-s(218–289)-Amyloids ohne signifikanten Einfluss auf die Gesamtstruktur ausgeschaltet werden kann. Daher werfen diese überraschenden Befunde die Frage auf, ob unerkannte „kongophobe“ Amyloidablagerungen weiteren, bisher unbekannten durch Proteinfaltung ausgelösten Krankheiten zugrunde liegen.

Die hier eingeführte Methode ist auch auf andere Liganden und Fibrillen sowie generell auf die Charakterisierung der Bindung kleiner Moleküle an unlösliche Proteine anwendbar. Insbesondere funktioniert unser Protokoll mit nicht-isotopenmarkierten Liganden, was die oft zeitaufwendige Synthese markierter Liganden überflüssig macht und das Sichten von Ligandenbibliotheken erleichtert. Letztendlich wird die detaillierte Kenntnis der Interaktion kleiner Moleküle mit dieser pharmakologisch wichtigen Klasse von Proteinen die Entwicklung verbesserter Amyloid-Indikatoren ermöglichen und auch die Forschung an Medikamenten fördern, welche die Bildung von Fibrillen und ihre Stabilität beeinflussen, sodass schließlich diese Klasse von Krankheiten verhindert oder geheilt werden kann.

Experimentelles

Die gefärbten NMR-Proben wurden präpariert, indem 15 mg fibrillisiertes, protoniertes Protein (hergestellt wie zuvor beschrieben)^[4b] mit einem zehnfachen Überschuss Kongorot als Dinatriumsalz (CR; CALBIOCHEM, Katalognummer 234610) in entionisiertem Wasser 5 d bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert wurde. Ungebundenes CR wurde danach durch fünf Zyklen Zentrifugation (bei 4000 rpm, 3220 g) und Wiederauflösen des Pellets in 50 mL deionisiertem Wasser abgewaschen. Der Überstand nach der letzten Zentrifugation war farblos. Alle Proben wurden in 50 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 7.4 aufgelöst. Schließlich wurden die Fibrillen in 2.5 mm Varian-Rotoren hinein ultrazentrifugiert (1 h bei 154000 g).^[22] Eine Vergleichsprobe ohne CR wurde parallel hergestellt und durch alle Schritte gleich behandelt bis auf die Zugabe von CR.

Ein zweiter Satz Proben wurde mit dreifach isotopenmarkiertem [^2H , ^{13}C , ^{15}N]-Proteinmaterial hergestellt, um für PT-Messungen eingesetzt zu werden. Nach dem Entsalzen wurde die Monomerlösung lyophilisiert, wieder in D_2O (99.85 % D_2O , EURISO-TOP) aufgelöst und sofort lyophilisiert. Nach einer weiteren Resuspension in D_2O wurde der pH-Wert der Lösung mit 3 M Tris in D_2O auf pH 7.4 eingestellt (nicht kompensiert für Effekte der Deuterierung auf die pH-Messung). Die Fibrillisierung erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Die Probe wurde in zwei Hälften geteilt; eine Hälfte wurde 5 d mit einem zehnfachen Überschuss CR ohne Isotopenmarkierung inkubiert. Danach wurden beide Proben fünfmal in D_2O gewaschen. Die Fibrillen wurden in 3.2 mm Bruker-Rotoren ultrazentrifugiert (1 h bei 107000 g), diesmal ohne Stabilisierung des pH-Werts, um eine Verunreinigung durch Protonen zu vermeiden. Die Vergleichsprobe wurde zu jedem Zeitpunkt gleich behandelt (bis auf die Zugabe von CR).

Eingegangen am 30. Dezember 2010,
veränderte Fassung am 3. März 2011
Online veröffentlicht am 17. Mai 2011

Stichwörter: Amyloide · Kongorot · Prionen · Proteine ·
Strukturaufklärung

- [1] F. Chiti, C. M. Dobson, *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, 75, 333.
- [2] S. Maji, M. Perrin, M. Sawaya, S. Jessberger, K. Vadodaria, R. Rissman, P. Singru, K. Nilsson, R. Simon, D. Schubert, D. Eisenberg, J. Rivier, P. Sawchenko, W. Vale, R. Riek, *Science* **2009**, 323, 328.
- [3] P. Westermark, M. D. Benson, J. N. Buxbaum, A. S. Cohen, B. Frangione, S.-I. Ikeda, C. L. Masters, G. Merlini, M. J. Saraiva, J. D. Sipeo, *Amyloid* **2007**, 14, 179.
- [4] a) C. Ritter, M.-L. Maddelein, A. B. Siemer, T. Lührs, M. Ernst, B. H. Meier, S. J. Saupé, R. Riek, *Nature* **2005**, 435, 844; b) C. Wasmer, A. Lange, H. Van Melckebeke, A. B. Siemer, R. Riek, B. H. Meier, *Science* **2008**, 319, 1523; c) H. Van Melckebeke, C. Wasmer, A. Lange, E. Ab, A. Loquet, A. Böckmann, B. H. Meier, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 13765.
- [5] H. Bannhold, *Muench. Med. Wochenschr.* **1922**, 69, 1537.
- [6] a) E. P. Benditt, N. Eriksen, C. Berglund, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1970**, 66, 1044; b) H. Puchtler, F. Sweat, M. Levine, *J. Histochem. Cytochem.* **1962**, 10, 355; c) P. Frid, S. V. Anisimov, N. Popovic, *Brain Res. Rev.* **2007**, 53, 135; d) M. Groenning, *J. Chem. Biol.* **2009**, 3, 1.
- [7] M. Higuchi, N. Iwata, Y. Matsuba, K. Sato, K. Sasamoto, T. Saido, *Nat. Neurosci.* **2005**, 8, 527.
- [8] a) A. Lorenzo, B. A. Yankner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 12243; b) I. Sánchez, C. Mahlke, J. Yuan, *Nature* **2003**, 421, 373; c) C. Lendel, C. W. Bertocini, N. Cremades, C. A. Waudby, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, D. Schenk, J. Christodoulou, G. Toth, *Biochemistry* **2009**, 48, 8322.
- [9] W. E. Klunk, J. W. Pettegrew, D. J. Abraham, *J. Histochem. Cytochem.* **1989**, 37, 1273.
- [10] a) P. Ladewig, *Nature* **1945**, 156, 81; b) A. J. Howie, D. B. Brewer, *Micron* **2009**, 40, 285.
- [11] W. Klunk, M. Debnath, A. Koros, J. Pettegrew, *Life Sci.* **1998**, 63, 1807.
- [12] D. Carter, K. Chou, *Neurobiol. Aging* **1998**, 19, 37.
- [13] a) H. Inouye, J. Nguyen, P. Fraser, L. Shinchuk, *Amyloid* **2000**, 7, 179; b) F. Cavillon, A. Elhaddaoui, A. Alix, S. Turrell, M. Dauchez, *J. Mol. Struct.* **1997**, 408–409, 185.
- [14] W. Jahnke, H. Widmer, *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, 61, 580.
- [15] M. Etzkorn, A. Böckmann, A. Lange, M. Baldus, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 14746.
- [16] a) P. C. A. van der Wel, J. R. Lowandowski, R. G. Griffin, *Biochemistry* **2010**, 49, 9457; b) A. Lange, K. Giller, S. Hornig, M. F. Martin-Eauclaire, O. Pongs, S. Becker, M. Baldus, *Nature* **2006**, 440, 959; c) L. B. Andreas, M. T. Eddy, R. M. Pielak, J. Chou, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 10958.
- [17] S. J. de Vries, M. van Dijk, A. M. Bonvin, *Nat. Protoc.* **2010**, 5, 883.
- [18] D. Barich, R. Pugmire, D. Grant, R. Iulucci, *J. Phys. Chem. A* **2001**, 105, 6780.
- [19] A. Petkova, W. Yau, R. Tycko, *Biochemistry* **2006**, 45, 498.
- [20] C. J. Sigurdson, K. Peter, R. Nilsson, S. Hornemann, G. Manco, M. Polymenidou, P. Schwarz, M. Leclerc, P. Hammarstrom, K. Wuthrich, A. Aguzzi, *Nat. Methods* **2007**, 4, 1023.
- [21] C. Casalone, G. Zanusso, P. Acutis, S. Ferrari, L. Capucci, F. Tagliavini, S. Monaco, M. Caramelli, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 3065.
- [22] A. Böckmann, C. Gardienet, R. Verel, A. Hunkeler, A. Loquet, G. Pintacuda, L. Emsley, B. H. Meier, A. Lesage, *J. Biomol. NMR* **2009**, 45, 319.