

Entschlüsselung einer repetitiven Amyloidsequenz: Korrelation von Biofilm-extrahierten und segmental markierten Curli-Fimbrien mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie

Tobias Schubeis, Puwei Yuan, Mumdooh Ahmed, Madhu Nagaraj, Barth-Jan van Rossum und Christiane Ritter*

Abstract: Curli sind funktionelle bakterielle Amyloide, die durch eine ausgefeilte Biogenesemaschinerie hergestellt werden. Einblicke in ihre Faltung und Regulierung kann unser Verständnis der Amyloidbildung erweitern. Allerdings ist die Aufklärung hochauflöster Strukturen von Amyloiden aufgrund ihrer Tendenz zu strukturellen Polymorphismen weiterhin eine Herausforderung. Hier vergleichen wir qualitativ hochwertige Festkörper-NMR-Spektren von Curli, die aus Biofilmen isoliert wurden, mit rekombinant hergestellten Curli, und zeigen so, dass sie eine ähnliche, gut definierte β -Solenoid-Struktur annehmen. Curli-Untereinheiten bestehen aus fünf repetitiven Sequenzwiederholungen, die in den NMR-Spektren zu einer starken Resonanzüberlagerung führen. Durch die Anwendung segmentaler Isotopenmarkierung ist es gelungen, die Signale einer einzelnen Sequenzwiederholung eindeutig zuzuordnen. Die gewonnenen Sekundärstrukturinformationen zeigen, dass alle Wiederholungen höchstwahrscheinlich strukturell äquivalent sind.

Amyloide sind seit langem als Resultat der Fehlfaltung von Proteinen bekannt und werden mit neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer- oder Parkinson-Krankheit in Verbindung gebracht.^[1,2] Jedoch können auch viele andere Proteine diese Quartärstruktur in vivo oder in vitro annehmen. Die Amyloidbildung wurde mittlerweile in Organismen aller Reiche nachgewiesen und wird von diesen zu verschiedensten biologischen Aufgaben genutzt.^[3,4] Diese funktionellen Amyloide sind keine Folge unkontrollierter Proteinfehlfaltung und bieten sich damit als natürlich vorkommende Modellsysteme an, um die Strukturen sowie zugrundeliegende Bildungs- und Kontrollmechanismen von Amyloiden zu untersuchen.^[5]

[*] Dr. T. Schubeis, P. Yuan, Dr. M. Ahmed, Dr. M. Nagaraj, Dr. C. Ritter
Laboratorium für makromolekulare Interaktionen
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig (Deutschland)
E-Mail: christiane.ritter@helmholtz-hzi.de

Dr. M. Nagaraj, Dr. B.-J. van Rossum
NMR-Supported Structural Biology
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP)
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)

Dr. M. Ahmed
Department of Physics, Faculty of Science, Suez University
Suez, 43533 (Ägypten)

Hintergrundinformationen und ORCID von Autoren zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201506772> zu finden.

Die Morphologie und die biophysikalischen Eigenschaften aller Amyloidfibrillen sind bemerkenswert ähnlich, obwohl sich ihre Primärstrukturen stark unterscheiden. Aufgrund des fibrillären Charakters von Amyloiden konnten hochauflöste Strukturinformationen erst durch Anwendung von Festkörper(FK)-NMR-Spektroskopie erlangt werden.^[6–8] Eine optimale Probenvorbereitung ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Strukturbestimmung mittels FK-NMR. Dazu werden Amyloidfibrillen typischerweise unter In-vitro-Bedingungen hergestellt, was zu Heterogenität oder Polymorphismen führen kann. Bei krankheitsassoziierten Amyloiden treten solche Polymorphismen sowohl in vitro als auch in vivo häufig auf und sind vermutlich die Basis für die Existenz verschiedener Prionstämme.^[9,10] Im Gegensatz dazu bestehen funktionelle Amyloide aus einer evolutionär optimierten Aminosäuresequenz, die unter physiologischen Bedingungen die Bildung einer einzigen definierten Molekülstruktur zu begünstigen scheint. Allerdings konnten in vitro ebenfalls schon Polymorphismen erzeugt werden.^[11]

Unter den funktionellen Amyloiden ist die Biogenese von Curli am besten verstanden.^[12,13] Curli sind Teil der extrazellulären Matrix von Enterobacteriaceae wie *Escherichia coli*. Sie spielen sowohl in der Biofilmbildung als auch in der Anhaftung an Wirtszellen und deren Invasion eine Rolle. Die Hauptuntereinheit von Curli, CsgA, besteht aus einem flexiblen N-terminalen Exportsignal (22 Aminosäuren), gefolgt von fünf imperfect repetitiven Einheiten (R1–R5), die den Amyloidkern bilden (Abbildung 1 a).^[14] Es wurde vorgeschlagen, dass die Glutamin- und Asparagin-Seitenketten Wasserstoffbrücken bilden und dadurch eine stabile Strang-Schleife-Strang-Struktur mit parallelen β -Faltblättern senkrecht zur Fibrillenachse entsteht (Abbildung 1 b).^[15] Ein neueres Strukturmodell wurde unter Verwendung von Kontaktinformationen, die aus Sequenzvergleichen abgeleitet wurden, berechnet.^[16] Weiterhin ist CsgA in vitro mittels verschiedener biophysikalischer Techniken untersucht worden.^[17] Native Curli wurden aus bakteriellen Biofilmen extrahiert, und 1D-¹³C-FK-NMR-Spektren wurden von Proben mit natürlichem Isotopenvorkommen gemessen.^[18] FK-NMR-Untersuchungen von rekombinanten CsgA-Fibrillen deuten auf eine β -Solenoid-Struktur hin, aber die publizierten Spektren zeigten relativ breite, schlecht aufgelöste Resonanzen, die keine eindeutige Zuordnung und detaillierte Strukturuntersuchung ermöglichten.^[19]

Hier präsentieren wir eine Strategie, um dieses hoch repetitive Protein einer detaillierten Analyse durch hochauflösende FK-NMR zugänglich zu machen, und um gleichzeitig

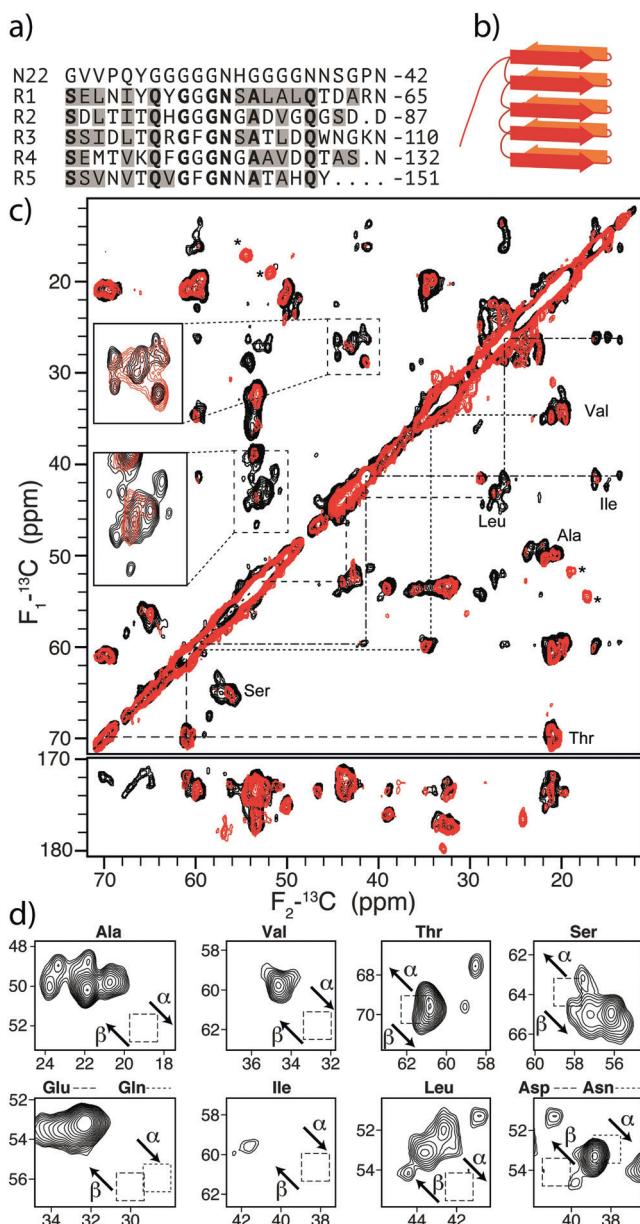


Abbildung 1. Vergleich nativer und rekombinanter Curli. a) Primärstruktur des *E. coli* CsgA. Die konservierten Reste in den verschiedenen Wiederholungen sind fett gedruckt; Reste, die wahrscheinlich β-Strang-Konformation annehmen, sind grau unterlegt. b) Modell des vorhergesagten Strang-Schleife-Strang-Motivs. c) 2D-¹³C-¹³C-Spektren der nativen Curli (rot) und der rekombinanter CsgA-Fibrillen (schwarz) bei 21 T mit DARR-Mischzeit von 50 ms. Die vergrößerten Regionen haben eine leicht unterschiedliche Prozessierung, um schwache Signale hervorzuheben. Nicht-Protein-Peaks sind mit einem Stern markiert. d) $\text{Ca}-\text{C}\beta$ -Regionen der ¹³C-¹³C-Korrelation von rekombinantern CsgA mehrerer Aminosäuren. Die gestrichelten Quadrate zeigen Zufallsknäuel-Regionen, die Pfeile zeigen die erwarteten Verschiebungen der Kreuzpeaks durch β-Faltblatt- oder α-helikale Konformation.^[22]

eine stringente Korrelation zur natürlichen Faltung zu gewährleisten. Hierfür haben wir zunächst einheitlich ¹³C, ¹⁵N-markierte native Curli aus Biofilmen des *E. coli*-Stammes MC4100, welche auf modifizierten M9-Agar-Platten gezüchtet wurden, extrahiert. Die Fibrillen wurden mit einer modi-

fizierten Version des etablierten Protokolls (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen) bis zur Homogenität gereinigt.^[20] Dies erlaubte uns, FK-NMR-Spektren von isotopenmarkierten Amyloiden, die direkt aus der nativen Umgebung gewonnen wurden, zu messen. Es ist davon auszugehen, dass die natürlichen Struktureigenschaften beibehalten wurden.

Allerdings sind die Ausbeuten nativ gereinigter Proteine in der Regel gering, und für komplexere Isotopenmarkierungsstrategien ist typischerweise rekombinant hergestelltes Protein erforderlich. Rekombinantes CsgA bildet Fibrillen unter verschiedenen In-vitro-Bedingungen.^[21]

Für FK-NMR-Spektroskopie werden jedoch Proben mit allerhöchster Homogenität benötigt. Daher war es wichtig, monomeres CsgA, das frei ist von jeglichen vorgebildeten Oligomeren, für die In-vitro-Fibrillenbildung zu verwenden, und ein Austrocknen der Probe zu jeder Zeit zu vermeiden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen unserer Präparationen sind in Abbildung S2 gezeigt.

Um die Probenqualität zu vergleichen, und um Spinsysteme in Spektren nativer und rekombinanter Curli zu identifizieren, haben wir 2D-¹³C-¹³C-DARR-Spektren mit kurzer Mischzeit (50 ms) aufgenommen (Abbildung 1c), welche vor allem Kreuzkorrelationen innerhalb einer Aminosäure zeigen. Auffallend ist die geringe Dispersion der Signale, vor allem in der Ca -Region, in der sich die meisten Kreuzsignale in einem Bereich von 3–4 ppm wiederfinden. Obgleich alle Arten von Aminosäuren anhand ihrer charakteristischen chemischen Verschiebungen identifizierbar waren, konnten fast keine isolierten Peaks ausgemacht werden. Obwohl die Signalintensitäten der nativen Probe aufgrund niedrigerer Ausbeute deutlich schwächer ausfielen, konnte der Großteil der Peaks in beiden Spektren identifiziert werden (siehe Einschübe in Abbildung 1c und Abbildung S3).

Ausnahmen sind wenige Nicht-Protein-Peaks in dem Spektrum nativer Curli, die auf eine Lipid-Verunreinigung zurückzuführen sind. Außerdem fehlen einzelne Resonanzen von Leucin- und Isoleucin-Seitenketten im Spektrum der nativen Probe sowie einige Kreuzsignale aufeinanderfolgender Reste, die im Spektrum des rekombinannten CsgA sichtbar sind. Beides ist mit der geringeren Signalintensität zu begründen. Wichtig ist vor allem, dass die in beiden Spektren vorhandenen Signale sehr gut überlappen. Dies deutet darauf hin, dass rekombinantes CsgA im Wesentlichen die gleiche Struktur wie native Curli annimmt.

Eine genauere Untersuchung der Isoleucin- und Alanin- $\text{C}\beta$ Kreuzsignale erlaubt die Identifizierung aller 3 Isoleucin- und von bis zu 8 (von 9) Alanin-Spinsystemen (Abbildung S4). Die wenigen isolierten Peaks sind bemerkenswert scharf, mit intrinsischen ¹³C-Linienbreiten um 0.35 ppm, was vergleichbar mit Linienbreiten der HET-s-Priondomäne ist und auf eine hohe Probenhomogenität hindeutet.^[23] Hinzu kommt, dass diese Reste innerhalb der Proteinsequenz gut verteilt sind (siehe Abbildung 1a). Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass CsgA-Fibrillen eine gut definierte Konformation annehmen.

Die Ca - und $\text{C}\beta$ -chemischen Verschiebungen der Aminosäuren sind ein guter Indikator für Sekundärstrukturelemente. Obwohl sich die Resonanzen einzelner Reste aufgrund der spektralen Überlappung nicht genau zuordnen

lassen, befinden sich doch sämtliche Kreuzsignale in Bereichen, die auf eine β -Faltblatt-Topologie hindeuten (Abbildung 1d), so wie es für Amyloidfibrillen zu erwarten ist. Mithilfe der Aminosäuretypen, die ausschließlich solche charakteristischen chemischen Verschiebungen der $\text{C}\alpha\text{-C}\beta$ -Kreuzsignale aufweisen, lassen sich zwei potenzielle β -Strang-Kernregionen, die in allen Wiederholungen (Abbildung 1a) konserviert sind, definieren. Eine genauere Analyse der Sekundärstruktur erfordert eine sequenzspezifische Signalzuordnung. In Anbetracht der Größe des amyloidbildenden Bereichs von CsgA (etwa 110 Reste) sind die Spektren erstaunlich leer. Dies liegt wahrscheinlich einerseits an den Sequenzwiederholungen, und andererseits an der repetitiven Anordnung des Proteins, bei der sich jede Sequenzwiederholung in einer ähnlichen chemischen Umgebung innerhalb der β -Strang-Anordnung befindet. Die starke Signalüberlappung kann durch Anwendung Stickstoff-korrelierter 3D-Spektren reduziert werden (Daten nicht gezeigt), dies ist aber nicht ausreichend, um eine vollständige Resonanzzuordnung zu erzielen.

Daher haben wir eine segmentale Isotopenmarkierung eingeführt, um eine eindeutige Signalzuordnung der ersten Wiederholung (R1) im Kontext des Vollängen-Proteins zu erreichen. Vor kurzem haben wir gezeigt, dass sich Inteinvermitteltes Protein-Trans-Spleißen für eine effiziente segmentale Isotopenmarkierung von Amyloidfibrillen einsetzen lässt.^[24] Entsprechend haben wir hier ein komplementäres Paar Fusionsproteine, bestehend aus den CsgA-Resten 21–69 oder 71–151 zusammen mit der N- oder C-terminalen Domäne des Inteins *NpuDnaE*, erzeugt (Abbildung 2a).

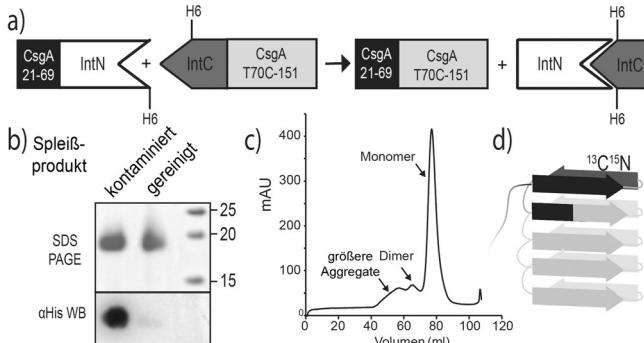


Abbildung 2. Herstellung von segmental markierten CsgA-Fibrillen. a) CsgA-Intein-Fusionsproteine und deren Spleißreaktion. Das isotopenmarkierte Fragment ist schwarz dargestellt. b) SDS-PAGE und Anti-His₆-tag-Western-Blot von kontaminiertem und gereinigtem segmental markiertem CsgA. c) Größenausschlusschromatogramm (Superdex 200) des segmental markierten CsgA. d) Amyloid-Modell zur Verdeutlichung des Markierungsmusters.

Thr70 wurde mit dem katalytischen Cystein des Inteins ersetzt, an der Spleißverbindung wurden keine weiteren Reste eingeführt. Durch das Mischen der Fusionsproteine unter reduzierenden Bedingungen konnten wir segmental markiertes CsgA herstellen, das während der Reaktion ausfiel (Abbildung S5). Die Reinheit dieses Präzipitats wurde durch SDS-PAGE und, da die Edukte und das Produkt genau in der gleichen Größe laufen, auch mittels Anti-His₆-Western-Blot

kontrolliert. Dabei zeigte sich eine starke Kontamination durch His₆-markierten Edukte (Abbildung 2b), die weitere Reinigungsschritte notwendig machte. Das Entfernen der His₆-markierten Verunreinigungen durch Affinitätschromatografie und abschließende Größenausschlusschromatografie (Abbildung 2c) unter denaturierenden Bedingungen erzielte reines, monomeres CsgA (Abbildung 2b) und daraus hervorgehend homogene Fibrillen. Das Isotopenmarkierungsmuster ist in Abbildung 2d dargestellt. Die Spektren des segmental und vollmarkierten CsgA zeigen hervorragende Übereinstimmung (Abbildung 3a). Alle Spinsysteme im iso-

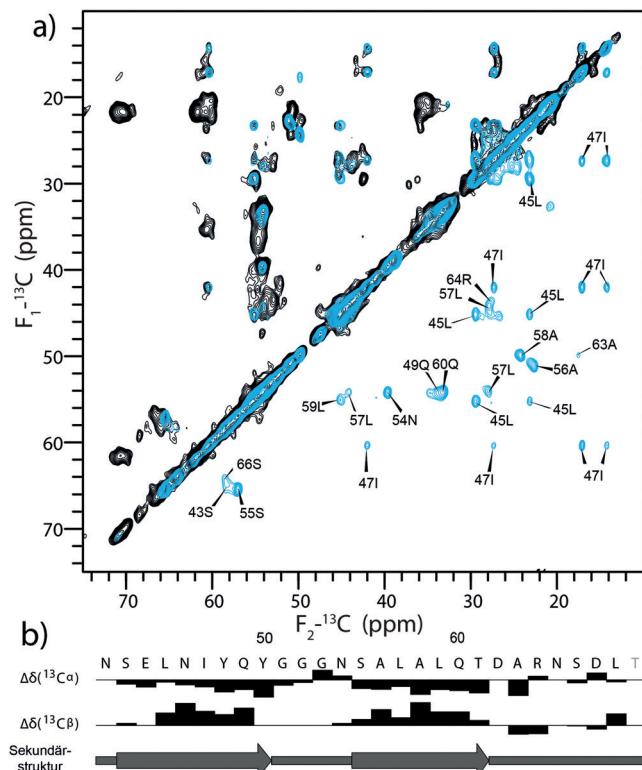


Abbildung 3. Resonanzzuordnung der Strukturwiederholung R1 von CsgA. a) ^{13}C - ^{13}C -Festkörper-NMR-Spektren von einheitlich (schwarz) und segmental (cyan) markierten CsgA-Fibrillen. Kreuzsignale der vollmarkierten Probe sind nur oberhalb der Diagonalen dargestellt, die Resonanzzuordnungen sind unterhalb der Diagonalen annotiert. Die Spektren wurden bei 21 T mit einer DARR-Mischzeit von 50 ms gemessen. b) Abweichung der chemischen Verschiebungen von Zufallsknäuel-Werten und die vorhergesagte Sekundärstruktur des CsgA R1.

topenmarkierten Segment überlagern perfekt mit Resonanzen der vollmarkierten Probe. Dies ist ein starkes Indiz, dass die Thr70Cys-Mutation keine strukturellen Veränderungen verursacht. Die Intensität der Kreuzsignale scheint sich leicht verbessert zu haben, wobei die intrinsischen Linienbreiten ähnlich scharf (≈ 0.35 ppm) bleiben. Die spektrale Überlagerung wurde drastisch reduziert, z.B. sind nur ein einziges Isoleucin und drei Alanine markiert und auch eindeutig nachweisbar.

Die durchweg hohe Ähnlichkeit der Spektren von R1 und vollmarkiertem CsgA stützt die Hypothese, dass die einzelnen Sequenzwiederholungen auch strukturelle Wiederho-

lungseinheiten bilden, womit sich auch die starke Signalüberlagerung in Spektren vollmarkierter Proben erklären lässt.

Aminosäure-spezifische Signalzuordnungen wurden unter Verwendung von 2D- und 3D-NCACX- und NCOCX-Spektren erreicht. Außer für Asp62 und Asn65 konnte jeder Rest in dem Segment 43–68 eindeutig zugeordnet werden (Abbildung 3 und S6). Die Detektion eines einzigen Satzes von gut aufgelösten NMR-Resonanzen bestätigt die Faltung in eine gut definierte Konformation. Eine Analyse der chemischen Verschiebungen unter Verwendung von CSI prognostiziert die Anwesenheit von zwei β -Strängen in der R1-Wiederholung, von Ser43 bis Tyr50 und Ser55 bis Thr61 (Abbildung 3b).^[25] Die kurze, starre Glycin-Schleife zwischen diesen beiden Strängen und die scheinbare spektroskopische Äquivalenz der Sequenzwiederholungen machen eine β -Solenoid-Anordnung plausibel. Um weitere Hinweise hierfür zu sammeln, haben wir ein 2D-DARR-Spektrum mit einer langen Mischzeit von 300 ms gemessen (Abbildung S7a). Segmentale Isotopenmarkierung von Amyloidfibrillen führt in solchen Spektren überwiegend zu Kreuzsignalen durch intramolekularen Polarisationstransfer.^[24] Neben den Korrelationen innerhalb einzelner Reste wurden rund 170 neue intramolekulare Kreuzpeaks im aliphatischen Bereich des Spektrums gefunden. Die überwiegende Mehrheit konnte sequenziellen Konnektivitäten oder mittellangen Abstandsbeschränkungen zugeordnet werden, welche als ausgezeichnete Kontrolle der sequenziellen Zuordnung dienen.

Neben den Abstandsbeschränkungen mittlerer Weite konnten wir auch zwei weitreichende Abstandsbeschränkungen zwischen Glu49 und Asn54/Ser55 identifizieren (Abbildung S7a). Diese Kontakte definieren eine enge Schleife zwischen den beiden β -Strängen (Abbildung S7b).^[26]

Die Reste 21–42 waren in den auf Kreuzpolarisation basierenden Spektren nicht detektierbar und sind daher wahrscheinlich flexibel. In der Tat konnten Resonanzen aller vermissten Aminosäuretypen in INEPT-basierten ^1H - ^{13}C -Korrelationen identifiziert werden (Abbildung 4). Interessanterweise konnten wir auch Resonanzen von Threonin, Aspartat und Alanin detektieren, die in der Sequenz 21–42 abwesend sind und sich stattdessen in der Schleife zwischen R1 und R2 befinden. Obwohl diese Reste auch durch Kreuzpolarisation nachweisbar sind, zeigt dies, dass diese Schleife möglicherweise flexibler ist als die kurze Glycin-Schleife zwischen den beiden β -Strängen in R1. Interessant ist, dass wir zusätzlich zwei Leucin-Seitenketten nachweisen konnten. Vorausgesetzt, dass die Sequenzwiederholungen eine repetitive Struktur bilden, in der die konservierten Glutamin- und Asparagin-Reste übereinanderliegen, ist es plausibel, dass tatsächlich zwei Leucin-Seitenketten nach außen zeigen und daher ausreichend flexibel sind, um in INEPT-Spektren detektiert zu werden. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass einige Leucin-Seitenketten den Spektren der nativen Curli fehlen.

Zusammenfassend haben wir anhand von FK-NMR-Daten Einblicke in die Struktur des funktionellen Amyloids Curli erhalten. Nach unserer Kenntnis zeigen wir hier zum ersten Mal hochauflöste NMR-Spektren eines funktionellen Amyloids, das direkt aus seiner natürlichen Umgebung

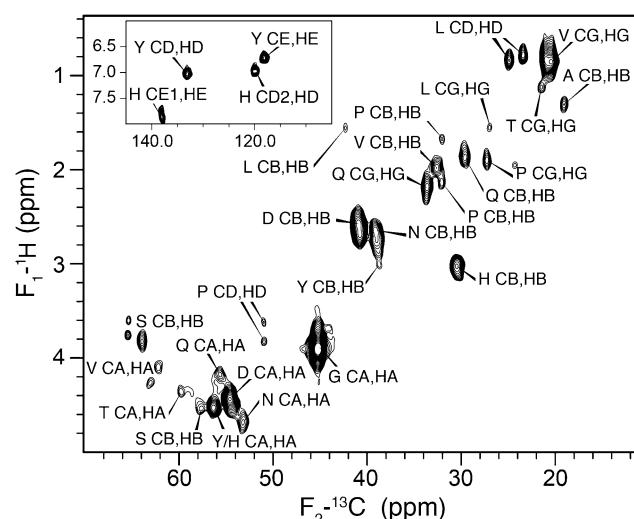


Abbildung 4. Mit INEPT detektierte Reste in segmental markierten CsgA-Fibrillen mit Zuordnung der Aminosäuretypen für die aliphatische und aromatische (Einschub) Region.

isoliert wurde. Die Spektren von einheitlich markierten Curli aus Biofilm und rekombinant hergestelltes CsgA weisen eine hohe Ähnlichkeit auf, was die Integrität der In-vitro-Präparate nachweist. Wir verwendeten segmentale Isotopenmarkierung der Wiederholung R1, um Sequenzspezifische Resonanzzuordnungen zu erhalten und um Hinweise auf eine sich strukturell wiederholende Anordnung der CsgA-Sequenz zu sammeln, welche vermutlich eine gut definierte β -Solenoid-Struktur annimmt.

Diese Studie zeigt deutlich die Perspektiven der segmentalen Isotopenmarkierung für die Strukturbestimmung von Proteinen mit sequenziellen oder strukturellen Wiederholungen. Die Markierung unterschiedlicher Wiederholungen in Kombinationen mit anderen Markierungsmustern, wie Strategien zur Verdünnung von Spins, sollte die vollständige Strukturberechnung von CsgA in Curli-Fibrillen durch FK-NMR ermöglichen.

Danksagung

Wir danken Manfred Rohde für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen, Thorsten Lührs (SeNostic GmbH) und Johannes Spehr (HZI Braunschweig) für kritische Diskussionen sowie der Graduiertenschule des HZI (Stipendium für T.S.) und der DFG (RI 2210/1-1 an M.A., RO 3496/3-1 an M.N.) für Unterstützung.

Stichwörter: Festkörper-NMR-Spektroskopie · Funktionelle Amyloide · Intein · Isotopenmarkierung · Proteinstrukturen

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 14669–14672
Angew. Chem. **2015**, *127*, 14880–14884

[1] F. Chiti, C. M. Dobson, *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 333–366.

[2] C. Ross, M. Poirier, *Nat. Med.* **2004**, *10 Suppl*, S10–7.

- [3] T. P. J. Knowles, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 384–396.
- [4] J. Greenwald, R. Riek, *Structure* **2010**, *18*, 1244–1260.
- [5] X. Wang, M. R. Chapman, *Prion* **2008**, *2*, 57–60.
- [6] R. Tycko, R. B. Wickner, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 1487–1496.
- [7] G. Comellas, C. M. Rienstra, *Annu. Rev. Biophys.* **2013**, *42*, 515–536.
- [8] A. K. Schütz, T. Vagt, M. Huber, O. Y. Ovchinnikova, R. Cadalbert, J. Wall, P. Güntert, A. Böckmann, R. Glockshuber, B. H. Meier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 331–335; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 337–342.
- [9] B. H. Meier, A. Böckmann, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2014**, *30C*, 43–49.
- [10] S. B. Prusiner, *Annu. Rev. Genet.* **2013**, *47*, 601–623.
- [11] C. Wasmer, A. Soragni, R. Sabaté, A. Lange, R. Riek, B. H. Meier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5839–5841; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5923–5925.
- [12] M. R. Chapman, L. S. Robinson, J. S. Pinkner, R. Roth, J. Heuser, M. Hammar, S. Normark, S. J. Hultgren, *Science* **2002**, *295*, 851–855.
- [13] M. L. Evans, M. R. Chapman, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2014**, *1843*, 1551–1558.
- [14] L. S. Robinson, E. M. Ashman, S. J. Hultgren, M. R. Chapman, *Mol. Microbiol.* **2006**, *59*, 870–881.
- [15] S. K. Collinson, J. M. Parker, R. S. Hodges, W. W. Kay, *J. Mol. Biol.* **1999**, *290*, 741–756.
- [16] P. Tian, W. Boomsma, Y. Wang, D. E. Otzen, M. H. Jensen, K. Lindorff-Larsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 22–25.
- [17] X. Wang, D. R. Smith, J. W. Jones, M. R. Chapman, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 3713–3719.
- [18] O. McCrate, X. Zhou, C. Reichhardt, L. Cegelski, *J. Mol. Biol.* **2013**, *425*, 4286–4294.
- [19] F. Shewmaker, R. P. McGlinchey, K. R. Thurber, P. McPhie, F. Dyda, R. Tycko, R. B. Wickner, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 25065–25076.
- [20] S. K. Collinson, L. Emödy, K. H. Müller, T. J. Trust, W. W. Kay, *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 4773–4781.
- [21] M. S. Dueholm, S. B. Nielsen, K. L. Hein, P. Nissen, M. Chapman, G. Christiansen, P. H. Nielsen, D. E. Otzen, *Biochemistry* **2011**, *50*, 8281–8290.
- [22] Y. Wang, O. Jardetzky, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 852–861.
- [23] A. B. Siemer, C. Ritter, M. Ernst, R. Riek, B. H. Meier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2441–2444; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2494–2497.
- [24] T. Schubeis, T. Lührs, C. Ritter, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 51–54.
- [25] D. S. Wishart, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2011**, *58*, 62–87.
- [26] A. V. Kajava, A. C. Steven, *Fibrous Proteins: Amyloids, Prions and Beta Proteins*, Elsevier, Amsterdam, **2006**.

Eingegangen am 22. Juli 2015

Online veröffentlicht am 16. Oktober 2015