

## Amyloidfibrillen

Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201511524  
Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201511524

## Polymorphismus von Amyloidfibrillen in vivo

*Karthikeyan Annamalai, Karl-Heinz Gührs, Rolf Koehler, Matthias Schmidt, Henri Michel, Cornelia Loos, Patricia M. Gaffney, Christina J. Sigurdson, Ute Hegenbart, Stefan Schönland und Marcus Fändrich\**

**Abstract:** Polymorphismus ist ein weit verbreitetes Merkmal von in vitro gebildeten Amyloid-artigen Fibrillen, doch blieb bislang unklar, ob Amyloidfibrillen in vivo ebenso von diesem Phänomen betroffen sind. Hier zeigen wir, dass sich verschiedene innerhalb eines Patienten gebildete Amyloidfibrillen erheblich in ihrer Morphologie unterscheiden können. Wir erhalten diesen Befund mit Amyloidfibrillen aus verschiedenen Organen, bestehend aus nicht-homologen Polypeptidketten sowie aus menschlichem und tierischem Gewebe. Unabhängig von Amyloidtyp und -herkunft finden wir, dass in vivo gebildete Amyloidfibrillen signifikant polymorphe Eigenschaften aufweisen. Diese Daten lassen darauf schließen, dass die chemischen Grundlagen jener Reaktionen, die in der Selbstorganisation zu Fibrillen zu Polymorphismus führen, in vivo und in vitro grundsätzlich konserviert sind.

Amyloidfibrillen sind lineare Aggregate aus selbstorganisierten Polypeptidketten.<sup>[1]</sup> Sie haben eine spezifische, intermolekulare  $\beta$ -Faltblattstruktur, die cross- $\beta$ <sup>[2,3]</sup> genannt wird und die im Körper von Menschen und Tieren im Laufe von Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson oder verschiedenen Formen systemischer Amyloidose auftritt.<sup>[1]</sup> Während die Vorläuferproteine dieser pathogenen Aggregate in der Regel auch im Reagenzglas Fibrillen bilden können, ist bis jetzt unklar, ob in vitro gebildete Fibrillen in ihren Struktureigenschaften jenen Fibrillen, die in Patienten oder erkrankten Tieren vorkommen, entsprechen. Diese Ungewissheit spiegelt sich auch in einer Empfehlung der International Society of Amyloidosis wider, nach der in vitro geformte Fibrillen

allgemein als „Amyloid-ähnlich“ bezeichnet und von in vivo gebildeten, Bona-Fide-Amyloidfibrillen unterschieden werden sollten.<sup>[4]</sup>

Ein wesentliches Merkmal von in vitro geformten Fibrillen ist ihr Strukturpolymorphismus. Das heißt, eine Fibrillenbildungsreaktion ruft ein mehr oder weniger diverses Spektrum von Fibrillenmorphologien hervor.<sup>[5,6]</sup> Änderungen der Bedingungen der Fibrillenbildung beeinflussen dieses Spektrum, machen es schmaler oder breiter, oder induzieren Fibrillenensembles, die auf Einzelpartikelebene in ihrer Zusammensetzung variieren.

Polymorphismen innerhalb einer Probe können für spektroskopische Techniken wie die NMR-Spektroskopie unsichtbar sein, wenn die Protomere in den verschiedenen Fibrillenmorphologien eine nahezu identische Konformation aufweisen. In diesen Fällen werden Einzelpartikeltechniken zu ihrer Darstellung benötigt. Während der Polymorphismus von in vitro gebildeten Fibrillen klar belegt ist,<sup>[6–8]</sup> blieb das Vorhandensein von polymorphen Fibrillenmorphologien im Fall von Patientenmaterial noch umstritten. So schlägt eine neue Veröffentlichung vor, dass A $\beta$ -Fibrillen eines Alzheimer-Patienten homogen sind, sich aber vom einen zum anderen Patienten unterscheiden können.<sup>[9]</sup> Ein solches Szenario könnte z.B. im Kontext personalisierter medizinischer Ansätze relevant sein.<sup>[10]</sup> Allerdings sind die Schlussfolgerungen in der besagten Studie nicht durch direkte Untersuchungen an Patientenfibrillen erhalten worden, sondern durch NMR-spektroskopische Analysen von isotonenmarkierten Fibrillen in vitro, die in Gegenwart von Hirnhomogenaten und Fibrillationskeimen gebildet wurden.

Im Unterschied dazu haben wir die Struktur von Fibrillen untersucht, die aus verschiedenen Amyloid-haltigen Geweben extrahiert wurden. Die Analyse erfolgt auf Einzelpartikelebene mit Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Das verwendete Verfahren zur Aufreinigung der Fibrillen beruht auf der ursprünglichen Wasserextraktionsmethode, welche die Wasserlöslichkeit von Amyloidfibrillen nutzt.<sup>[11]</sup> Angewendet auf das Herzamyloid einer 51-jährigen Frau, die an Leichtketten(AL)-Amyloidose leidet, finden wir mittels TEM und Negativ-Kontrastierung deutlich sichtbare Fibrillen (Abbildung 1 A). Die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigt die verhältnismäßig hohe Reinheit der Fibrillenproteine und das Vorhandensein einer dominierenden Proteinspezies bei 12 kDa (Abbildung 1 B). Durch Verwendung von Edman-Abbau und Massenspektrometrie konnte die Aminosäuresequenz des AL-Proteins bestimmt werden (Abbildung 1 A der Hintergrundinformationen (SI)). Sie entspricht einem N-terminalen Fragment einer  $\lambda$ 1-Leichtkette, das durch Sequenzierung der cDNA des mali-

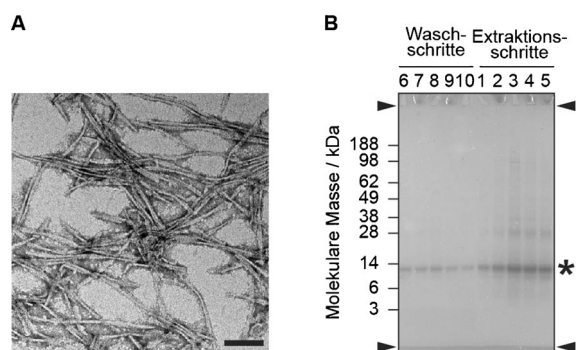
[\*] K. Annamalai, Dr. M. Schmidt, H. Michel, C. Loos, Prof. Dr. M. Fändrich  
Institut für Proteinbiochemie, Universität Ulm  
Helmholtzstraße 8/1, 89081 Ulm (Deutschland)  
E-Mail: marcus.faendrich@uni-ulm.de

Dr. K.-H. Gührs  
CF Protemics, Leibniz Institut für Altersforschung –  
Fritz Lipmann Institut (FLI)  
Jena (Deutschland)

Dr. R. Koehler  
Institut für Humangenetik  
Universität Heidelberg (Deutschland)

Dr. P. M. Gaffney, Prof. Dr. C. J. Sigurdson  
Department of Pathology, University of California, San Diego (USA)  
Priv.-Doz. Dr. U. Hegenbart, Priv.-Doz. Dr. S. Schönland  
Amyloidose Zentrum  
Abteilung für Innere Medizin V  
Universität Heidelberg (Deutschland)

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind unter:  
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.201511524> zu finden.



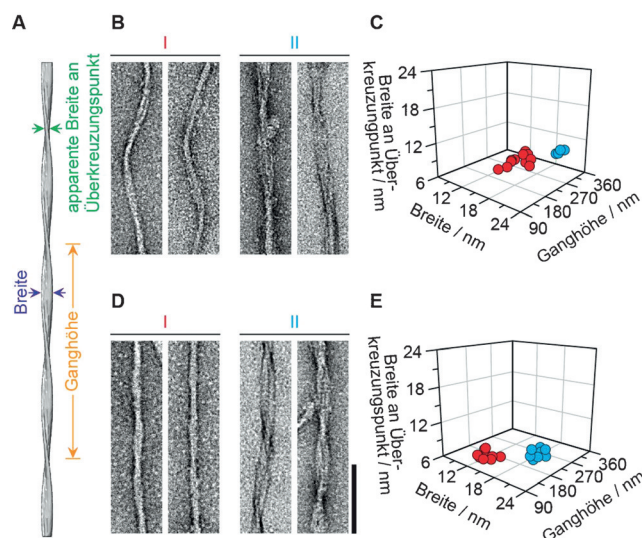
**Abbildung 1.** A) Negativ-kontrastierte TEM-Aufnahme von extrahierten Amyloidfibrillen aus AL-Herzgewebeproben des Falles 1. B) Coomassie-gefärbtes denaturierendes Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen der letzten fünf Tris-EDTA-Waschschriffe und der ersten fünf Wasserextraktionsschritte. Der Stern zeigt das AL-Protein an. Die Pfeilspitzen markieren die Gelränder.

genen  $\lambda$ -Plasmazellklons, welcher der Krankheit zugrunde liegt, gewonnen wurde (Abbildung 1A der SI). Mittels Massenspektrometrie wurde die Masse des AL-Proteins bestimmt  $[(12168 \pm 4) \text{ Da}]$ ; Abbildung 1B der SI], die gut mit der theoretisch erwarteten Masse (12167 Da) übereinstimmt.

Die extrahierten Fibrillen zeigen die klassischen Merkmale einer Amyloidstruktur und werden von typischen Amyloid-bindenden Farbstoffen wie Kongorot und Thioflavin T gefärbt (Abbildung 2A,B der SI). Sie führen auch zu grüner Doppelbrechung nach Kongorot-Färbung. Durch Infrarotspektroskopie mit abgeschwächter Totalreflexion lassen sich ein hoher  $\beta$ -Faltblattanteil (Abbildung 2C der SI) sowie ein Amid-I-Maximum bei  $\tilde{\nu} = 1636 \text{ cm}^{-1}$  nachweisen.

Eine quantitative Erfassung der Fibrillenmorphologie mittels TEM in Form von Messungen der helikalen Ganghöhe, der Fibrillenbreite und der apparenten Breite der Fibrille an den Überkreuzungspunkten (Abbildung 2) teilt die Fibrillen dieses AL-Patienten in mindestens zwei verschiedene Gruppen, hier Morphologie I und II genannt, ein (Abbildung 2B,C). Morphologie I ist deutlich dünner [durchschnittliche Breite  $(14 \pm 1.4) \text{ nm}$ ] als Morphologie II [durchschnittliche Breite  $(19 \pm 0.8) \text{ nm}$ ] und zeigt weniger gut ausgeprägte Überkreuzungspunkte (Abbildung 2B). Sehr ähnliche Befunde wurden mit einem zweiten Fall einer menschlichen kardialen AL-Amyloidose erzielt, in dem das Untersuchungsgut aus dem explantierten Herzen einer 56 Jahre alten Frau gewonnen wurde (Abbildung 3A der SI). Diese Fibrillen enthalten ein anderes Leichtkettenfragmentprotein (Abbildung 3B der SI) als im Fall 1, zeigen aber auch die typischen Amyloidmerkmale nach Farbstoffbindung oder im Infrarot (Abbildung 4 der SI). Mittels TEM konnten mindestens zwei klar unterschiedliche Fibrillenmorphologien nachgewiesen werden, die sich in ihren durchschnittlichen Breiten  $[(11.6 \pm 0.6) \text{ gegenüber } (20.6 \pm 1.3) \text{ nm}]$  und Ganghöhen  $[(163 \pm 7) \text{ gegenüber } (212 \pm 23) \text{ nm}]$  unterscheiden. Das heißt, Morphologie I ist dünner als Morphologie II und weist deutlichere Überkreuzungspunkte auf.

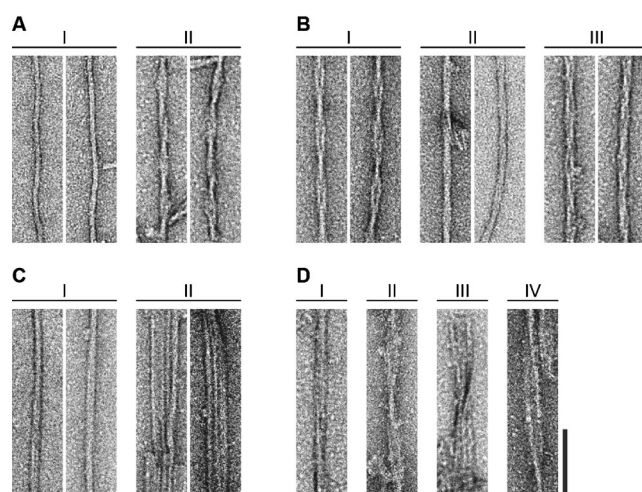
Nachdem wir den Polymorphismus in beiden AL-Amyloidosefällen nachgewiesen hatten, wendeten wir uns der mt-ATTR-Amyloidose zu, die auf der Fehlfaltung von mutiertem



**Abbildung 2.** A) Schematische Darstellung der Parameter Fibrillenbreite, -ganghöhe und -breite an einem Überkreuzungspunkt basierend auf Elektronenmikroskopie, Datenbankeintrag EMD-3132.<sup>[12]</sup> Negativ-kontrastierte TEM-Aufnahmen von AL-Amyloidfibrillen [Fall 1, (B)] und ein Graph der Strukturparameter (C). Negativ-kontrastierte TEM-Aufnahmen von AL-Amyloidfibrillen [Fall 2, (D)] und ein Graph der Strukturparameter (E). Maßstabsbalken 100 nm.

Transthyretin beruht. Die untersuchten Fibrillen stammen hier aus dem Herzgewebe eines 64 Jahre alten Mannes mit einer Val40Ile-Mutation. Wieder gibt es mehr als eine gut aufgelöste Fibrillenmorphologie. Morphologie I ist dünner und zeigt außerdem auch keine klar erkennbaren Überkreuzungspunkte, während Morphologie II eine deutlichere Periodizität entlang der Fibrillenhauptachse aufweist (Abbildung 3A).

Polymorphismus ist nicht nur mit menschlichen Fibrillen assoziiert, er wurde von uns auch bei tierischen Amyloidfibrillen beobachtet, z. B. bei Fibrillen, die aus den Nieren von AA-amyloiden Mäusen (*Mus musculus*; Abbildung 3B)<sup>[13]</sup>



**Abbildung 3.** Negativ-kontrastierte mt-ATTR-Amyloidfibrillen aus menschlichem Herz (A) und AA-Amyloidfibrillen aus Mausniere (B), Fuchsnieren (C) und Ziegenuterus (D). Maßstabsbalken 100 nm.

und Inselfüchsen (*Urocyon littoralis*; Abbildung 3 C)<sup>[14]</sup> sowie aus dem Uterus von AA-amyloiden Ziegen (*Capra aegagrus hircus*; Abbildung 3 D) gewonnen wurden.<sup>[15]</sup> Diese Fibrillen bestehen aus SAA1- (Maus)<sup>[13]</sup> oder SAA3-Protein (Ziege)<sup>[15]</sup> oder aus Homologen von SAA1 oder SAA2 im Fuchs.<sup>[14]</sup> In allen Fällen fanden wir mehrere Morphologien (Abbildung 3 B–D), wobei wir in unseren Abbildungen in der Regel nur ausgewählte Fibrillenmorphologien darstellen und darüber hinaus nur eine kleine Anzahl aller Fibrillen eines erkrankten Tieres oder Menschen extrahieren und analysieren konnten.

Auf Grundlage dieser Befunde schlussfolgern wir, dass der Körper eines jeden hier untersuchten Patienten oder Tieres mehrere Fibrillenmorphologien enthielt und dass der Polymorphismus von Amyloidfibrillen ein somit weit verbreitetes, wenn nicht ein konserviertes Merkmal von Amyloidfibrillen in vivo darstellt. Er betrifft Fibrillen, die von nicht-homologen Proteinen gebildet und in verschiedenen Organen abgelagert wurden und anschließend Krankheiten in Mensch oder Tier verursachen. Unsere Daten ähneln außerdem früheren Beobachtungen, die eine unterschiedliche Farbstoffaffinität von histologischen Schnitten berichten und möglicherweise auf dem Polymorphismus von Fibrillen in vivo beruhen.<sup>[16,17]</sup> Mithilfe eines Kontrollversuchs konnten wir des Weiteren zeigen, dass unsere Extraktionsprozedur die Morphologie von vorgeformten Fibrillen nicht nennenswert zerstört (Abbildung 5 der SI).

Die molekulare Grundlage des Fibrillenpolymorphismus liegt in Variationen in der Zahl, Orientierung oder Substruktur der Protofilamente.<sup>[18]</sup> Unterschiedliche Anordnungen der Protofilamente gehen mit geänderten Interaktionsflächen zwischen benachbarten Protofilamenten einher, während Unterschiede in der Protofilament-Substruktur verschiedene Konformationen und/oder Anordnungen der Polypeptidketten innerhalb eines Protofilaments implizieren.<sup>[19]</sup> Diese Unterschiede entstehen letztlich im Rahmen von Variationen während der Fibrillenbildung und der Ausformung strukturell verschiedener Fibrillationskeime, die in der Folge zu unterschiedlichen Fibrillenmorphologien auswachsen können. In der Tat weisen frühere Studien auf stochastische Variationen im Keimbildungsprozess hin,<sup>[20]</sup> und schließlich zeigen Moleküldynamik-Simulationen, dass bei der Bildung von polymorphen Fibrillen auch kinetische Faktoren eine entscheidende Rolle spielen können.<sup>[21]</sup>

Darüber hinaus ist der Prozess der Fibrillenbildung selbstverständlich auch abhängig von den Umweltbedingungen, und Veränderungen in der Temperatur oder Lösungszusammensetzung können die bevorzugten Interaktionen zwischen den Polypeptidketten beeinflussen. Allerdings gibt es derzeit nur unzureichende Vorstellungen darüber, wie eine bestimmte Lösungszusammensetzung zu einem bestimmten Fibrillenensemble führen kann. Eine Studie zum Polymorphismus von A $\beta$ -Fibrillen berichtet von einer Reduktion von Fibrillenmorphologien mit exponierten hydrophoben Oberflächen in Gegenwart kosmotroper Salzionen.<sup>[22]</sup> Innerhalb einer Zelle wird die Fibrillenmorphologie allerdings zusätzlich von Faktoren wie makromolekularem Gedränge, molekularen Chaperonen oder Lipiddoppelmembranen beeinflusst.

Hinzu kommen Substanzen wie Glykosaminoglykane, die in den Aggregationsmechanismus eingreifen können.<sup>[23]</sup> So könnte die Interaktion mit den regelmäßigen Mustern der Polysaccharide spezielle Fibrillenstrukturen induzieren. Ein weiteres Beispiel bilden Prionenstämme, wo verschiedene Prionenstrukturen ihre eigene Replikation induzieren und spezifische Krankheitsphänotypen hervorrufen können.<sup>[2]</sup> Während all diese Faktoren die Varianz der in vivo gebildeten Fibrillen beeinflussen könnten, ist bislang unklar geblieben, inwieweit diese ausreichen, die Homogenität der Fibrillen innerhalb eines Patienten zu erklären.

Unsere Beobachtungen von verschiedenen in vivo gebildeten Fibrillenmorphologien zeigen, dass solche Faktoren in den untersuchten Fällen nicht die Bildung polymorpher Fibrillenstrukturen zu unterdrücken vermögen. Die Selbstorganisation von Polypeptidketten folgt somit in vivo ähnlichen chemischen Prinzipien wie die Fibrillenbildung in einem Reaktionsgefäß.

### Experimentelles

Vorschrift zur Fibrillenextraktion: Fibrillen wurden von Amyloidhaltigem Gewebe durch ein abgewandeltes Wasserextraktionsverfahren gewonnen.<sup>[11]</sup> 250 mg Gewebe wurden mit einem Skalpell geschnitten und fünfmal mit 0.5 mL Tris-Calcium-Puffer (20 mM Tris, 138 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 % NaN<sub>3</sub>, pH 8.0) gewaschen. Jeder Waschschritt bestand aus schonendem Vortexen und Zentrifugieren bei 3100 g für 1 min bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 mL frisch hergestellter 5 mg mL<sup>-1</sup> *Clostridium-histolyticum*-Kollagenase-Lösung (Sigma) in Tris-Calcium-Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht auf einem horizontalen Kreisschüttler bei 750 rpm wurde das Gewebematerial bei 3100 g für 30 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in 0.5 mL Tris-Ethylendiamintetraessigsäure-(EDTA)-Puffer (20 mM Tris, 140 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.1 % NaN<sub>3</sub>, pH 8.0) resuspendiert und mit einem Kontes-Pellet-Mörser homogenisiert (5 Zyklen bestehend aus 1 s an und 1 s aus). Das Homogenat wurde 5 min bei 3100 g und 4°C zentrifugiert, und der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Dieser Schritt wurde neunmal wiederholt. Nach dem zehnten Homogenisationsschritt mit Tris-EDTA-Puffer wurde das Gewebepellet in 0.5 mL eiskaltem Wasser mit einem Kontes-Pellet-Mörser homogenisiert. Das Homogenat wurde 5 min bei 3100 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand entfernt und als Wasserextrakt 1 gelagert. Dieser Schritt wurde neunmal wiederholt.

TEM: Negativ-kontrastierte TEM-Proben wurden hergestellt, indem 5  $\mu$ L Probenlösung auf einem mit Formvar überzogenen und kohlebedampften 200-Mesh-Kupfernetzchen (Plano) immobilisiert wurden. Nach 1 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die überschüssige Lösung vorsichtig mit einem Filterpapier abgesaugt. Anschließend wurde das Kupfernetzchen dreimal mit Wasser gewaschen und dreimal mit einer 2 % (w/v) Uranylacetatlösung gefärbt. Die Kupfernetzchen wurden mit einem JEM-1400-TEM (JEOL) belichtet, das bei 120 kV betrieben wurde. Zur Messung der Fibrillengängehöhe und -breite sowie der Breite der Überkreuzungspunkte wurde die Software ImageJ verwendet. Die gesammelten Daten wurden mithilfe der Origin-Software aufgetragen.

### Danksagung

Wir danken herzlich den Patienten und ihren Familien für ihre Unterstützung unserer wissenschaftlichen Aktivitäten



durch die Spende der explantierten Herzen der Patienten. Diese Arbeit wurde unterstützt vom BMBF (GERAMY network on systemic AL amyloidosis in Germany, FKZ 01GM110) und Mitteln der DFG für M.F. (FA 456/15-1). Wir danken dem Institut für Kardiologie und Herzchirurgie, Universitätsklinikum Heidelberg, für ihre Unterstützung.

**Stichwörter:** Alzheimer · Amyloide beta-Peptide · Parkinson · Prionen · Proteinfaltung

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 4822–4825  
*Angew. Chem.* **2016**, 128, 4903–4906

- 
- [1] F. Chiti, C. M. Dobson, *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, 75, 333–366.  
[2] D. Eisenberg, M. Jucker, *Cell* **2012**, 148, 1188–1203.  
[3] M. Sunde, L. C. Serpell, M. Bartlam, P. E. Fraser, M. B. Pepys, C. C. Blake, *J. Mol. Biol.* **1997**, 273, 729–739.  
[4] J. D. Sipe, M. D. Benson, J. N. Buxbaum, S. Ikeda, G. Merlini, M. J. Saraiva, P. Westermark, *Amyloid* **2014**, 21, 221–224.  
[5] J. Meinhardt, C. Sachse, P. Hortschansky, N. Grigorieff, M. Fändrich, *J. Mol. Biol.* **2009**, 386, 869–877.  
[6] C. S. Goldsbury, G. J. Cooper, K. N. Goldie, S. A. Müller, E. L. Saafi, W. T. Gruijters, M. P. Misur, A. Engel, U. Aebi, J. Kistler, *J. Struct. Biol.* **1997**, 119, 17–27.  
[7] R. Kodali, A. D. Williams, S. Chemuru, R. Wetzel, *J. Mol. Biol.* **2010**, 401, 503–517.  
[8] J. L. Jiménez, E. J. Nettleton, M. Bouchard, C. V. Robinson, C. M. Dobson, H. R. Saibil, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 9196–9201.  
[9] J. X. Lu, W. Qiang, W. M. Yau, C. D. Schwieters, S. C. Meredith, R. Tycko, *Cell* **2013**, 154, 1257–1268.  
[10] A. Aguzzi, A. D. Gitler, *Cell* **2013**, 154, 1182–1184.  
[11] M. Pras, M. Schubert, D. Zucker-Franklin, A. Rimon, E. C. Franklin, *J. Clin. Invest.* **1968**, 47, 924–933.  
[12] M. Schmidt, A. Rohou, K. Lasker, J. K. Yadav, C. Schiene-Fischer, M. Fändrich, N. Grigorieff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, 112, 11858–11863.  
[13] K. Lundmark, G. T. Westermark, S. Nyström, C. L. Murphy, A. Solomon, P. Westermark, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 6979–6984.  
[14] P. M. Gaffney, D. M. Imai, D. L. Clifford, M. Ghassemian, R. Sasik, A. N. Chang, T. D. O'Brien, J. Coppinger, M. Trejo, E. Masliah, L. Munson, C. Sigurdson, *PLoS One* **2014**, 9, e113765.  
[15] P. M. Gaffney, B. Barr, J. D. Rowe, C. Bett, I. Drygiannakis, F. Giannitti, M. Trejo, M. Ghassemian, P. Martin, E. Masliah, C. J. Sigurdson, *FASEB J.* **2015**, 29, 911–919.  
[16] G. Heilbronner, Y. S. Eisele, F. Langer, S. A. Kaeser, R. Novotny, A. Nagarathinam, A. Aslund, P. Hammarström, K. P. Nilsson, M. Jucker, *EMBO Rep.* **2013**, 14, 1017–1022.  
[17] J. Bergström, A. Gustavsson, U. Hellman, K. Sletten, C. L. Murphy, D. T. Weiss, A. Solomon, B. O. Olofsson, P. Westermark, *J. Pathol.* **2005**, 206, 224–232.  
[18] M. Fändrich, J. Meinhardt, N. Grigorieff, *Prion* **2009**, 3, 89–93.  
[19] J. J. Wiltzius, M. Landau, R. Nelson, M. R. Sawaya, M. I. Apostol, L. Goldschmidt, A. B. Soriaga, D. Cascio, K. Rajashankar, D. Eisenberg, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, 16, 973–978.  
[20] T. Christopeit, P. Hortschansky, V. Schroeckh, K. Gührs, G. Zandomenighi, M. Fändrich, *Protein Sci.* **2005**, 14, 2125–2131.  
[21] R. Pellarin, P. Schuetz, E. Guarnera, A. Caflisch, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 14960–14970.  
[22] K. Klement, K. Wieligmann, J. Meinhardt, P. Hortschansky, W. Richter, M. Fändrich, *J. Mol. Biol.* **2007**, 373, 1321–1333.  
[23] J. McLaurin, T. Franklin, X. Zhang, J. Deng, P. E. Fraser, *Eur. J. Biochem.* **1999**, 266, 1101–1110.

Eingegangen am 11. Dezember 2015  
Online veröffentlicht am 8. März 2016