

## Hochauflösende Festkörper-NMR-Spektroskopie am Prionprotein HET-s in seiner amyloiden Form\*\*

Ansgar B. Siemer, Christiane Ritter, Matthias Ernst, Roland Riek und Beat H. Meier\*

Die hochauflösende Festkörper-NMR-Spektroskopie entwickelt sich momentan zu einer Technik, die eine Bestimmung der Strukturen biologischer Makromoleküle in atomarer Auflösung ermöglicht. Das Hauptaugenmerk liegt auf mikrokristallinen und nichtkristallinen Festkörpern, da insbesondere für letztere derzeit keine befriedigenden Methoden zur Strukturaufklärung existieren. Durch die erfolgreiche Zuordnung der Resonanzfrequenzen in Proteinen und Peptiden mit bis zu 100 Aminosäuren<sup>[1-5]</sup> und durch die Bestimmung der Struktur der SH3-Domäne mit 62 Aminosäuren<sup>[6]</sup> wurde die Basis für die Anwendung der Festkörper-NMR-Spektroskopie auf nanokristalline Festkörper bereits gelegt. Hier präsentieren wir die Verwendung von hochauflösender Festkörper-NMR-Spektroskopie zur Strukturaufklärung der Amyloid-Fibrillen eines Prionproteins.

Die oben genannten ersten Anwendungen der Festkörper-NMR-Spektroskopie in der Strukturaufklärung wurden durch den technischen Fortschritt der letzten Jahre und durch die Entwicklung neuer Pulssequenzen ermöglicht.<sup>[7]</sup> Insbesondere konnte die Linienbreite in den <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-Spektren vollständig markierter mikrokristalliner Proben auf 0.5–0.8 ppm reduziert werden.<sup>[5,8]</sup> Diese Linienbreite stammt teilweise von den homonuklearen *J*-Kopplungen, und in Proben ohne direkt gebundene <sup>13</sup>C-Atome konnten Linienbreiten bis zu 0.2 ppm beobachtet werden.<sup>[8]</sup> Hier zeigen wir, dass solche Linienbreiten (d.h. bis zu 0.25 ppm für Resonanzen mit aufgelösten *J*-Kopplungen oder 0.5 ppm für Resonanzen ohne aufgelöste *J*-Kopplungen) auch in Spektren von Amyloid-Fibrillen, in unserem Fall dem amyloidogenen Fragment 218–289 des Prionproteins HET-s aus *Podospora anserina*, erreicht werden können.

Das Protein HET-s ist an einem genetisch kontrollierten Zelltodphänomen beteiligt, der heterokaryotischen Inkompatibilität.<sup>[9,10]</sup> Es wird von dem Gen *het-s* codiert, einem der

mindestens neun *het*-Loci, die an der heterokaryotischen Inkompatibilität beteiligt sind, und kann zwei unterschiedliche Formen annehmen, eine Prionform und eine Nichtprionform. Die Prionform aggregiert in vivo zu Amyloid-Fibrillen.<sup>[11]</sup> Auch rekombinantes HET-s kann in vitro zu Amyloid-Fibrillen aggregieren,<sup>[12]</sup> wobei das C-terminale Fragment von Aminosäure 218–289 (HET-s(218–289)) den proteaseresistenten Teil der Fibrille bildet. Dieses Fragment hat die Aminosäuresequenz KI DAIVGRNSAK DIRTEERARV QLGNVVTAAG LHGGIRISDQ TTNSVETVVG KGE-SRVLIGN EYGGKGFWDN und bildet in vitro bereits Amyloid-Fibrillen.<sup>[13]</sup> Zelllinien, die HET-s in seiner Nichtprionform [HET-s\*] exprimieren, können durch Kontakt mit Prionzelllinien [HET-s] oder durch Einbringen von HET-s-Fibrillen<sup>[14]</sup> aus dem ganzen Protein oder dem Fragment HET-s(218–289)<sup>[13]</sup> in die Prionform überführt werden. Aus diesem Grund wird angenommen, dass dieses Fragment nicht nur für die Bildung von Fibrillen, sondern auch für die Verbreitung des Prions ausschlaggebend ist.

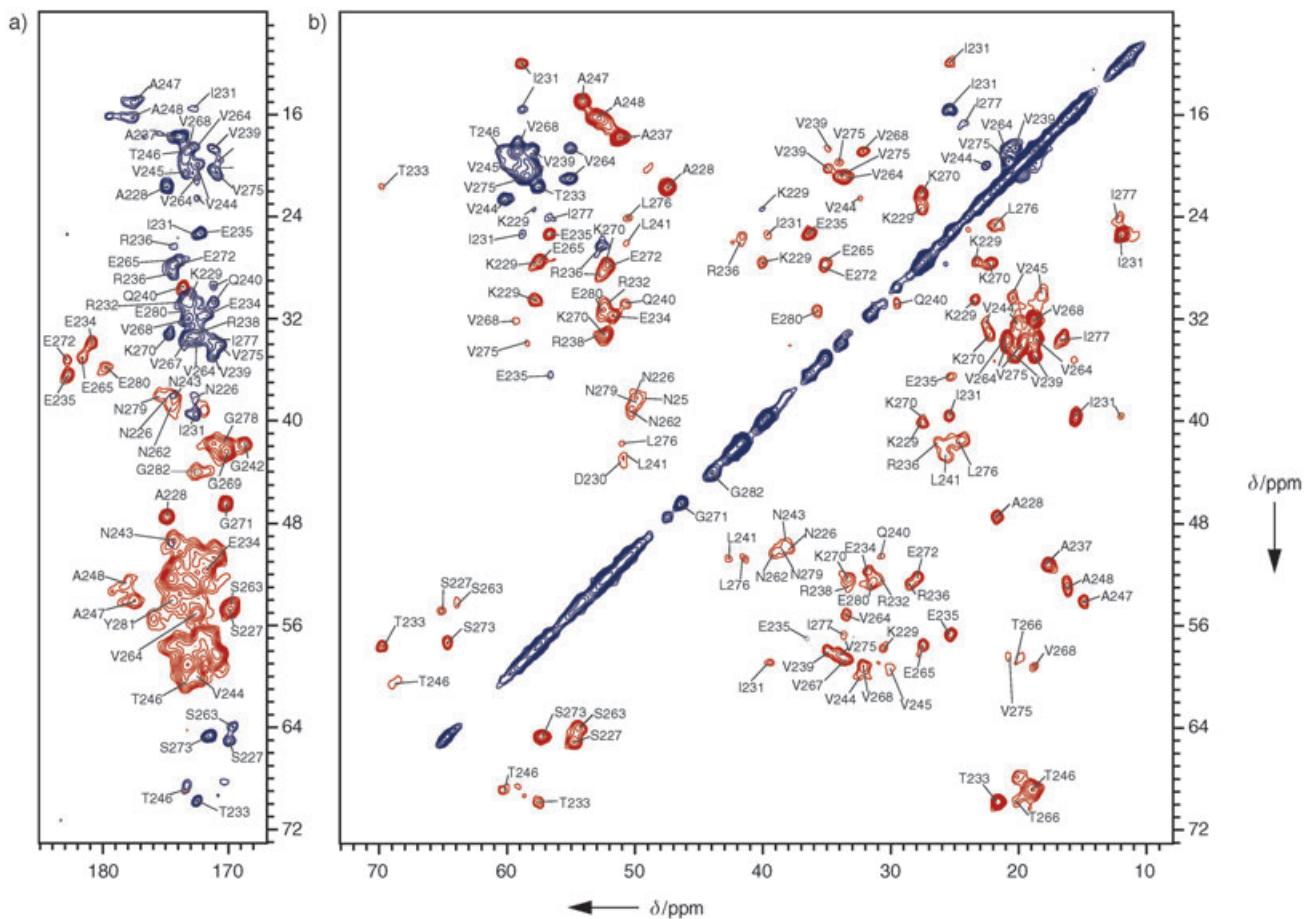
Unseres Wissens wurden bisher keine Festkörper-NMR-Spektren von Prionen mit einer für eine Resonanzzuordnung ausreichenden Auflösung publiziert. Hingegen sind ähnlich gut aufgelöste Spektren anderer Amyloide wie des A-β-Peptids<sup>[15,16]</sup> und des Transthyretins(105–115)<sup>[17]</sup> mit Linienbreiten von 1 bis 2 ppm sowie mit noch etwas geringeren Linienbreiten für bestimmte Methylgruppen<sup>[16]</sup> veröffentlicht. Die Festkörper-NMR-Spektren eines Fragmentes des Säuger-Prionproteins (PrP)<sup>[18,19]</sup> zeigen eine deutlich geringere spektrale Auflösung.

Abbildung 1 zeigt homonukleare <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C-Korrelationspektren des fibrillisierten HET-s(218–289)-Proteins mit einem C-terminalen His-Tag, die mit einem DREAM-Polarisationstransfer (DREAM = dipolare Rückkopplung, unterstützt durch Amplitudenmodulation)<sup>[20,21]</sup> bei einer MAS-Frequenz (MAS = Rotation um den magischen Winkel) von 40 kHz aufgenommen wurden. Die C'-C<sup>α</sup>- und C'-C<sup>α</sup>-C<sup>β</sup>-Korrelationen in Abbildung 1a wurden in zwei unterschiedlichen Experimenten erhalten, wobei die tangentiale Rampe der Radiofrequenzamplitude während der DREAM-Pulssequenz einmal von tiefer zu hoher Amplitude und einmal von hoher zu tiefer Amplitude verlief. Die Beschriftungen in Abbildung 1 entsprechen der vorläufigen Zuordnung der Resonanzen, die in Tabelle 1 zu finden sind. Die Resonanzzuordnung wurde über zwei- und dreidimensionale heteronukleare (<sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C, <sup>13</sup>C)-Korrelationsspektren ermittelt, wobei für die Polarisationstransferschritte ausschließlich adiabatische Techniken<sup>[1,22]</sup> verwendet wurden. Diese Zuordnung der Resonanzfrequenzen beschränkt sich auf zwei getrennte, aber kontinuierliche Segmente innerhalb des Peptids, nämlich auf die 23 Aminosäuren der Positionen 226–248 und die 20 Aminosäuren der Positionen 262–282 (siehe auch Tabelle 1), wobei Aminosäure 274 im zweiten Segment fehlt. Obwohl diese Resonanzzuordnung fast alle Signale in unseren Spektren erklärt (mit einigen Ausnahmen in der aromatischen Region und sehr wenigen nicht zugeordneten Kreuzpeaks in anderen Regionen), bleiben die Signale von 29 Aminosäuren unsichtbar. Die Resonanzen der sechs Aminosäuren des His-Tags konnten ebenfalls nicht zugeordnet werden. Das Fehlen der Resonanzen ist nicht auf ineffiziente Kreuzpolarisation

[\*] A. B. Siemer, Dr. M. Ernst, Prof. Dr. B. H. Meier  
Laboratorium für Physikalische Chemie  
ETH Zürich  
ETH-Hönggerberg, 8093 Zürich (Schweiz)  
Fax: (+41) 1632-1621  
E-mail: beme@ethz.ch

Dr. C. Ritter, Prof. Dr. R. Riek  
Structural Biology Laboratory  
The Salk Institute  
La Jolla, 92037 CA (USA)

[\*\*] Wir bedanken uns bei Andreas Hunkeler und Urban Meier für ihre technische Unterstützung, bei Dr. René Verel und Rochus Keller für anregende wissenschaftliche Diskussionen und bei Dr. Thorsten Luehrs für EM-Bilder. Diese Arbeit wurde vom Schweizer Nationalfonds (SNF) und der ETH Zürich unterstützt.



**Abbildung 1.** Homonucleare  $^{13}\text{C}$ -DREAM-Korrelationsspektren von fibrillisiertem HET-s(218–289), aufgenommen bei 40 kHz MAS. Die niedrigste Konturlinie ist so gewählt, dass sie gerade über dem Rauschen liegt (5 % der Maximalintensität). Aufeinander folgende Konturniveaus unterscheiden sich um den Faktor 1.4. Positive Konturen sind blau, negative rot. Die Spektren wurden vor der Fourier-Transformation mit einer verschobenen  $\sin^2$ -Funktion multipliziert, und die Daten wurden mit Nullen auf 2048 Punkte ergänzt. a) Carbonyl-Region der DREAM-Spektren. Die positiven Konturlinien stammen von einem Spektrum, das mit tangentialer, von hoher zu tiefer Amplitude führender DREAM-Einstrahlung aufgenommen wurde; die negativen Konturlinien stammen von einem ähnlichen Spektrum mit einer Amplitudenvariation von Tief nach Hoch. b) Aliphatische Region des DREAM-Spektrums, aufgenommen mit einer Amplitudenvariation von Tief nach Hoch.

zurückzuführen. In PDSD-Korrelationsspektren (PDSD = protonengetriebene Spindiffusion) ohne anfängliche Kreuzpolarisation (direkte Anregung der Kohlenstoff-Magnetisierung durch einen  $90^\circ$ -Puls) zeigten sich lediglich einige zusätzliche Diagonalsignale in der Region der aromatischen Resonanzen, aber keine neuen Kreuzpeaks, die eine Zuordnung der fehlenden 29 Reste ermöglicht hätten. In unseren Proben führte eine NOE-Vorsättigung zu einer deutlichen Verstärkung der Signale, allerdings konnten hiermit ebenfalls keine zusätzlichen Resonanzen beobachtet werden.

Die von uns beobachteten Linien sind erstaunlich schmal. Abbildung 2 ist ein Ausschnitt aus Abbildung 1, der die beiden gut isolierten Kreuzpeaks Gly271 und Ala228 sowie eindimensionale Schnitte durch diese zeigt. In der  $\delta_2$ -Dimension erkennt man deutlich die Aufspaltung durch die  $J$ -Kopplung, und auch mehrere andere CO-Resonanzen zeigen Aufspaltungen durch die  $J$ -Wechselwirkung. Die Linienform von Gly271 kann beispielsweise durch zwei Gauß-Linien beschrieben werden, die auf halber Höhe eine Breite von 30 Hz oder 0.2 ppm (linke Linie) bzw. 37 Hz oder 0.24 ppm (rechte Linie) und eine Aufspaltung von 54 Hz aufweisen.

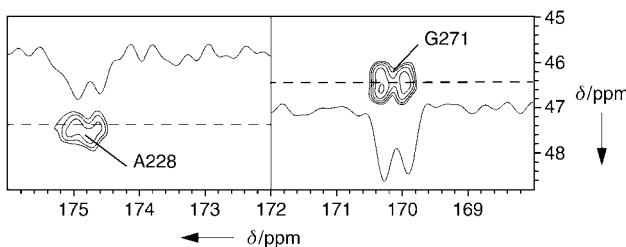
Diese Linie ist genauso schmal wie entsprechende Linien aus mikrokristallinen Proben, was eine auf molekularer Ebene hoch geordnete Struktur der HET-s-Fibrillen nahelegt.

Die Beobachtung hoher molekularer Ordnung ist nicht in Einklang mit der Tatsache, dass die Resonanzen von mehr als einem Drittel der Aminosäuren nicht zu sehen sind, was wiederum nur mit einer hohen molekularen Unordnung erklärbar ist. Diese Unordnung kann entweder statisch oder dynamisch sein, die von uns bisher gemessenen Daten lassen keine eindeutige Aussage zu. Die Unordnung betrifft allerdings nur einen Teil des Einzelmoleküls und muss daher deutlich von der veränderlichen Helixsteigung unterschieden werden, die z. B. mit Elektronenmikroskopie beobachtet werden konnte.<sup>[23]</sup> Statische Unordnung kann in Proteinen zu einer Linienbreite von bis zu 10 ppm führen, was dem gesamten Bereich entspricht, über den sich die Resonanzfrequenzen der Kohlenstoffatome im Proteinrückgrat bei freier Wahl des Torsionswinkels ändern können.<sup>[24]</sup> Bei einer derart starken Unordnung würde die Linienbreite in eindimensionalen Spektren um einen Faktor 20 und in zweidimensionalen Spektren bis zu einem Faktor 20<sup>2</sup> ansteigen, sodass die Linien

**Tabelle 1:** Chemische Verschiebungen ( $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$ ) des Proteinrückgrates der zugeordneten Fragmente von HET-s(218–289).<sup>[a]</sup>

Aminosäure	N	C'	$\text{C}^\alpha$	Aminosäure	N	C'	$\text{C}^\alpha$
Asn 226	125.5	–	49.9	Asn 262	128.2	–	50.3
Ser 227	119.2	169.9	54.7	Ser 263	117.6	169.8	54.3
Ala 228	122.7	174.9	47.4	Val 264	125.6	172.5	55.0
Lys 229	123.6	–	57.7	Glu 265	127.3	174.0	57.4
Asp 230	117.7	–	51.1	Thr 266	112.8	171.0	58.9
Ile 231	122.7	172.6	58.9	Val 267	124.1	–	58.5
Arg 232	129.8	–	52.1	Val 268	128.6	173.2	59.2
Thr 233	113.5	172.5	57.6	Gly 269	113.4	170.0	42.5
Glu 234	120.0	171.8	51.7	Lys 270	121.5	174.7	52.3
Glu 235	117.3	172.2	56.6	Gly 271	115.6	170.1	46.4
Arg 236	122.8	174.3	52.6	Glu 272	128.6	174.3	52.1
Ala 237	126.0	173.9	51.1	Ser 273	116.3	171.5	57.2
Arg 238	117.9	172.7	52.9	–	–	–	–
Val 239	122.7	171.1	58.0	Val 275	122.9	170.7	58.2
Gln 240	126.7	171.1	50.7	Leu 276	130.6	–	50.6
Leu 241	131.4	–	50.6	Ile 277	130.3	171.3	56.6
Gly 242	113.7	168.7	41.8	Gly 278	111.3	170.0	41.9
Asn 243	109.9	174.3	49.2	Asn 279	114.5	171.0	49.8
Val 244	122.8	172.5	60.0	Glu 280	120.4	–	52.6
Val 245	129.3	–	59.2	Tyr 281	128.9	174.4	54.0
Thr 246	116.7	173.3	60.4	Gly 282	109.9	172.3	44.0
Ala 247	121.1	177.4	54.1	–	–	–	–
Ala 248	119.3	177.6	53.0	–	–	–	–

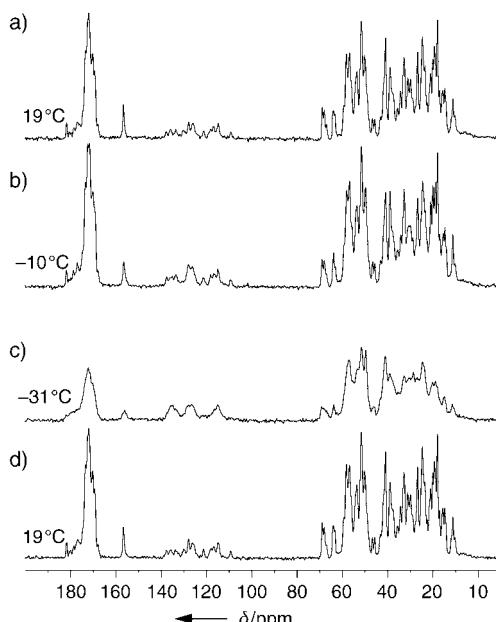
[a]  $^{13}\text{C}$ -Verschiebungen sind auf Tetramethylsilan bezogen,  $^{15}\text{N}$ -Verschiebungen auf flüssigen Ammoniak.



**Abbildung 2:** Ausschnitt aus Abbildung 1a mit den  $\text{C}^\alpha$ - $\text{C}'$ -Kreuzpeaks von Ala 228 und Gly 271 sowie eindimensionale Schnitte durch diese Signale. Um eine maximale Auflösung zu erreichen, wurde vor der Fourier-Transformation keine Fensterfunktion verwendet. Das durch die  $J$ -Kopplung aufgespaltene Signal von Gly 271 wird am besten durch eine Gauß-Linie mit einer Breite von 30 Hz für die rechte und 37 Hz für die linke Linie und einer  $J$ -Kopplung von 54 Hz beschrieben. Solche Unterschiede in den Linienbreiten der beiden Linien wurden auch in einfachen Modellsystemen beobachtet und sind unseres Wissens noch nicht verstanden.

nicht beobachtbar wären. Dynamische Unordnung kann ebenfalls zu sehr breiten Linien führen, falls die molekulare Dynamik spektrale Komponenten im kHz-Bereich hat und dadurch mit der Rotation um den magischen Winkel oder der Entkopplung interferiert.  $T_{1\rho}$ -Effekte können wir als Grund für die fehlenden Signale der 29 Aminosäuren ausschließen, da auch in den direkt angeregten PDSD-Spektren, wie schon erwähnt, keine zusätzlichen Kreuzpeaks zu finden waren.

Es wurde versucht, die mögliche Dynamik der unsichtbaren Aminosäuren auszufrieren. Die zugehörigen eindimensionalen  $^{13}\text{C}$ -CP-MAS-Spektren (CP = Kreuzpolarisation) von HET-s(218–289) sind in Abbildung 3 dargestellt. Unterhalb  $-20^\circ\text{C}$  konnten wir zwar eine deutliche Verbreiterung



**Abbildung 3:** Temperaturserie von  $^{13}\text{C}$ -CP-Spektren von HET-s(218–289), aufgenommen bei 25 kHz MAS: a)  $19^\circ\text{C}$ , 256 Experimente; b)  $-10^\circ\text{C}$ , 256 Experimente; c)  $-31^\circ\text{C}$ , 256 Experimente; d)  $19^\circ\text{C}$  (erwärmte nach Abkühlung auf  $-31^\circ\text{C}$ ), 430 Experimente.

der Linien beobachten, aber die Linienzahl scheint unabhängig von der Temperatur zu sein. Die temperaturabhängigen Änderungen im Spektrum waren reversibel.

Wir haben gezeigt, dass in den Fibrillen des Prionprotein-Fragmentes HET-s(218–289) ca. zwei Drittel des Proteinmoleküls hoch geordnet sind und dass man für den Bereich der restlichen Aminosäuren deutliche Hinweise auf eine starke molekulare Unordnung findet. Die geordneten und ungeordneten Teile können unterschiedlichen Segmenten des Proteins zugeordnet werden (Tabelle 1). Die geringe Linienbreite in den NMR-Spektren und die erfolgreiche Zuordnung der Resonanzfrequenzen belegen das Potenzial der Festkörper-NMR-Spektroskopie für die Bestimmung der atomaren Struktur von Prionen in ihrer amyloiden Form. Die Ermittlung von Strukturinformation aus den Festkörper-NMR-Spektren ist derzeit in Arbeit.

## Experimentelles

Alle Spektren wurden auf einem Bruker-AV-600-Spektrometer mit einer Protonenresonanzfrequenz von 600.13 MHz aufgenommen. Für die 1D-CP-MAS-Spektren verwendeten wir einen Varian-Probenkopf (2.5 mm) bei einer MAS-Frequenz von 25 kHz. Die Mischzeit der Kreuzpolarisation betrug 1 ms, wobei RF-Feldstärken von 70 kHz auf  $^{13}\text{C}$  und 95 kHz auf  $^1\text{H}$  verwendet wurden. Zur Protonenentkopplung wurde die Entkopplungssequenz  $\text{XiX}$  ( $\tau_p = 74 \mu\text{s}$ )<sup>[25]</sup> mit einer RF-Feldstärke von 130 kHz eingesetzt. Die  $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren wurden mit einem 1.8-mm-Probenkopf<sup>[26]</sup> bei einer MAS-Frequenz von 40 kHz und einer Proben temperatur von  $15^\circ\text{C}$  aufgenommen. Die Mischzeit der Kreuzpolarisation war hier 1 ms, und die RF-Feldstärke betrug 90 kHz für  $^{13}\text{C}$  und 130 kHz für  $^1\text{H}$ . Die Mischzeit in der DREAM-Sequenz<sup>[20,21]</sup> betrug 7 ms, wobei die RF-Feldstärke tangential zwischen 15 und 26 kHz variiert wurde. Für die tangentiale Amplitudenrampe verwendeten wir folgende Parameter:<sup>[21]</sup>  $\Delta_{\text{rf}}/2\pi = 4.5 \text{ kHz}$ ,  $d_{\text{est}} = 1.5 \text{ kHz}$  und  $\bar{\omega}_1/2\pi = 20 \text{ kHz}$ . Während der DREAM-Sequenz kam CW-Entkopplung und während  $t_1$  und  $t_2$

XiX-Entkopplung ( $\tau_p = 70 \mu\text{s}$ ) zum Einsatz, jeweils bei einer RF-Feldstärke von 150 kHz. Die spektrale Breite betrug 40 kHz. 62 Experimente wurden für jede der 1024  $t_1$ -Zeiten aufaddiert, was zu einer Gesamtzeit von 55 Stunden führte.<sup>[27]</sup> Die Daten wurden mit dem Programm XWINNMR (Bruker Biospin) prozessiert und mit dem Programm CARA analysiert.

eingegangen am 15. Dezember 2004  
online veröffentlicht am 16. März 2005

**Stichwörter:** Fibrillen · NMR-Spektroskopie · Prione · Proteinstrukturen · Strukturaufklärung

- [1] A. Detken, E. H. Hardy, M. Ernst, M. Kainosh, T. Kawakami, S. Aimoto, B. H. Meier, *J. Biomol. NMR* **2001**, *20*, 203.
- [2] A. McDermott, T. Polenova, A. Böckmann, K. W. Zilm, E. K. Paulsen, R. W. Martin, G. T. Montelione, *J. Biomol. NMR* **2000**, *16*, 209.
- [3] A. Böckmann, A. Lange, A. Galinier, S. Luca, N. Giraud, M. Juy, H. Heise, R. Montserret, F. Penin, M. Baldus, *J. Biomol. NMR* **2003**, *27*, 323.
- [4] J. Pauli, M. Baldus, B. van Rossum, H. de Groot, H. Oschkinat, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 272.
- [5] T. I. Igumenova, A. E. McDermott, K. W. Zilm, R. W. Martin, E. K. Paulson, A. J. Wand, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6720.
- [6] F. Castellani, B. van Rossum, A. Diehl, M. Schubert, K. Rehbein, H. Oschkinat, *Nature* **2002**, *420*, 98.
- [7] S. Dusold, A. Sebald, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **2000**, *41*, 185.
- [8] F. Castellani, B. J. van Rossum, A. Diehl, K. Rehbein, H. Oschkinat, *Biochemistry* **2003**, *42*, 11476.
- [9] N. L. Glass, I. Kaneko, *Eukaryotic Cell* **2003**, *2*, 1.
- [10] S. J. Saupe, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, *64*, 489.
- [11] V. Coustou-Linaires, M.-L. Maddelein, J. Begueret, S. J. Saupe, *Mol. Microbiol.* **2001**, *42*, 1325.
- [12] S. Dos Reis, B. Coulary-Salin, V. Forge, I. Lascu, J. Begueret, S. J. Saupe, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 5703.
- [13] A. Balguerie, S. Dos Reis, C. Ritter, S. Chaignepain, B. Coulary-Salin, V. Forge, K. Bathany, I. Lascu, J.-M. Schmitter, R. Riek, S. J. Saupe, *EMBO J.* **2003**, *22*, 2071.
- [14] M. L. Maddelein, S. Dos Reis, S. Duvezin-Caubet, B. Coulary-Salin, S. J. Saupe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 7402.
- [15] R. Tycko, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 96.
- [16] A. T. Petkova, G. Buntkowsky, F. Dyda, R. D. Leapman, W. M. Yau, R. Tycko, *J. Mol. Biol.* **2004**, *335*, 247.
- [17] C. P. Jaroniec, C. E. MacPhee, V. S. Bajaj, M. T. McMahon, C. M. Dobson, R. G. Griffin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 711.
- [18] J. Heller, A. C. Kolbert, R. Larsen, M. Ernst, T. Bekker, M. Baldwin, S. B. Prusiner, A. Pines, D. E. Wemmer, *Protein Sci.* **1996**, *5*, 1655.
- [19] D. D. Laws, H. M. L. Bitter, K. Liu, H. L. Ball, K. Kaneko, H. Wille, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, A. Pines, D. E. Wemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 11686.
- [20] R. Verel, M. Baldus, M. Ernst, B. H. Meier, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *287*, 421.
- [21] R. Verel, M. Ernst, B. H. Meier, *J. Magn. Reson.* **2001**, *150*, 81.
- [22] M. Ernst, B. H. Meier in *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*, Vol. 9 (Hrsg.: D. M. Grant, R. K. Harris), Wiley, Chichester, **2002**, S. 23.
- [23] J. L. Jimenez, J. I. Guijarro, E. Orlova, J. Zurdo, C. M. Dobson, M. Sunde, H. R. Saibil, *EMBO J.* **1999**, *18*, 815.
- [24] A. C. Dedios, J. G. Pearson, E. Oldfield, *Science* **1993**, *260*, 1491.
- [25] A. Detken, E. H. Hardy, M. Ernst, B. H. Meier, *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *356*, 298.
- [26] A. Samoson, T. Tuherm, J. Past, *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *365*, 292.
- [27] R. L. J. Keller, The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial, Cantina, Goldau, **2004**.