

Polarisationstransfer über die Wasser-Protein-Grenzfläche im Festkörper**

Anne Lesage,* Carole Gardiennet, Antoine Loquet, René Verel, Guido Pintacuda,
Lyndon Emsley, Beat H. Meier und Anja Böckmann*

Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Wasser sind wichtig für die Struktur, die richtige Faltung und Dynamik von Biomolekülen. Somit sind diese dynamischen Wechselwirkungen ein essentieller Faktor in chemischen Prozessen in lebenden Organismen. Die Charakterisierung von Wasser-Protein-Wechselwirkungen hat sich generell als schwierig erwiesen, es ist allerdings unerlässlich zum Verständnis der oben genannten Prozesse. Darüber hinaus resultiert der Kontrast in Magnetresonanztomogrammen aus der Tatsache, dass die Wasser-Relaxationszeit vom Gewebetyp abhängt.^[1] Selbst wenn die Wassereigenschaften durch Hinzugeben von paramagnetischen Agentien verändert werden,^[2] bleiben die Wechselwirkungen zwischen Wasser und den zellulären Komponenten ausschlaggebend für das Relaxationsverhalten von Wasser in Gewebe und Zellen.

Viele Informationen über Protein-Wasser-Wechselwirkungen kommen aus der Kernspinresonanz (NMR) in flüssiger Phase. Die magnetische Resonanz bietet zwei komplementäre Ansätze zum Erfassen von Wasser-Protein-Wechselwirkungen: NMR-Spektroskopie^[3] und Magnetresonanzdispersion^[4] (MRD). Die Daten aus diesen beiden Methoden können heute in einem konsistenten Modell interpretiert werden, das die Phänomene in flüssiger Phase beschreibt.^[3-7] Unlängst hat der Zugang zu isotopenangereicherten mikrokristallinen Proteinproben die Möglichkeit eröffnet, Wasser-Protein-Wechselwirkungen in festen Proteinen ortsaufgelöst zu untersuchen.^[8-12] Allerdings ist der Weg des Polarisationstransfers in hydratisierten festen Proben momentan noch nicht im Detail geklärt. Es ist zu beachten, dass die in Fest-

körpern vorkommenden säkularen dipolaren Wechselwirkungen weitere Polarisationstransferwege zu dem bereits komplexen, mit Lösungs-NMR-Spektroskopie identifizierten Netzwerk addieren, das aus direkten und indirekten Wasser-Protein-Polarisationstransferwegen via chemischen Austausch und Kern-Overhauser-Effekt (NOE) besteht. Der NOE-Transferweg in festen Proteinen wurde von Zilm und Mitarbeitern^[9] beschrieben und chemischer Austausch in Lit. [8,11,12].

Hier beschreiben wir Experimente, die es ermöglichen, die Anteile der unterschiedlichen Transferwege in mikrokristallinen Proteinproben zu ermitteln. Hierzu wurde der Wasser-Protein-Polarisationstransfer entweder in unterkühlten Proben über ein relativ breites Temperaturintervall oder mittels schneller Rotation um den magischen Winkel (MAS) untersucht. Es hat sich gezeigt, dass bei Raumtemperatur oder bei langsamer Probenrotation der chemische Austausch mit anschließender Spindiffusion der wichtigste Transferweg ist. Bei niedrigen Temperaturen oder bei schneller Probenrotation wird der Anteil eines dieser beiden Schritte vermindert, und Overhauser-Effekte gewinnen an Wichtigkeit.

Ein Schlüssel zu den hier erläuterten Beobachtungen ist die Möglichkeit, das Lösungsmittelwasser in der mikrokristallinen Proteinprobe (Crh-Protein) zu unterkühlen. Dies ermöglicht uns, das betrachtete Intervall zur Untersuchung der Wasser-Protein-Wechselwirkungen zu verbreitern, ohne die signifikante Linienvverbreiterung, die am Gefrierpunkt des Lösungsmittels auftritt, zu induzieren.^[13,14] Wir nutzen hier die Tatsache, dass unsere Probe 10% Polyethylenglycol (PEG) 6000 enthält, und dass PEG die Keimbildung von Eis in wässrigen Lösungen beeinflusst. Dies führt zu verstärktem Unterkühlen mit ansteigender molarer Masse des PEG.^[15] Abbildung 1 zeigt diesen Effekt anhand von Punkten innerhalb eines Gefrier-Auftau-Zyklus, die eine Hysterese beschreiben. Wir verwenden ein Temperaturintervall, das bis ca. -20°C reicht, wo der unterkühlte Zustand ausreichend lang stabil ist, um zweidimensionale Spektren aufzunehmen. Die Wasser-Protein-Wechselwirkungen äußern sich in 2D-¹³C-¹H-HETCOR-Spektren in den Kreuzsignalen an der Wasserfrequenz in ω_1 .^[8-11,17] Abbildung 2a zeigt die Ausschnitte an der Wasser-Frequenz in ω_1 , die aus 2D-HETCOR-Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen erhalten wurden (alle angegebenen Temperaturen sind Probentemperaturen, siehe auch Hinweise im Abschnitt *Experimentelles*).

Bei 20°C kann man die Kreuzsignale identifizieren, die zu E70-Cδ, Y80-Cζ, His-Cε1 und -Cδ2, Thr-Cβ und -Cγ, Ser-Cβ, N-ter-Met1-Cα sowie Lys-Cε und -Cδ gehören.^[8,11,18] Fast alle Kreuzsignale verlieren beim Absenken der Probentemperatur an Intensität, mit Ausnahme der His-Resonanzen (alle im

[*] Dr. A. Lesage, Dr. G. Pintacuda, Prof. L. Emsley
Université de Lyon, CNRS/ENS Lyon/UCB-Lyon 1
Centre de RMN à Très Hauts Champs
5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne (Frankreich)
Fax: (+33) 4-7272-8860
E-Mail: anne.lesage@ens-lyon.fr

Dr. C. Gardiennet, A. Loquet, Dr. A. Böckmann
Institut de Biologie et Chimie des Protéines
UMR 5086 CNRS/Université de Lyon 1, IFR 128 BioSciences
7 passage du Vercors, 69367 Lyon (Frankreich)
Fax: (+33) 4-7272-2649
E-Mail: a.bockmann@ibcp.fr

Dr. R. Verel, Prof. B. H. Meier
ETH Zürich (Schweiz)

[**] Diese Arbeit wurde von der französischen ANR (JC05_44957, ANR-07-PCVI-0013-03) unterstützt. Die NMR-Spektren wurden an der Rhône-Alpes Large Scale Facility for NMR gemessen. Wir danken Birgit Habenstein für die deutsche Übersetzung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200801110> zu finden.

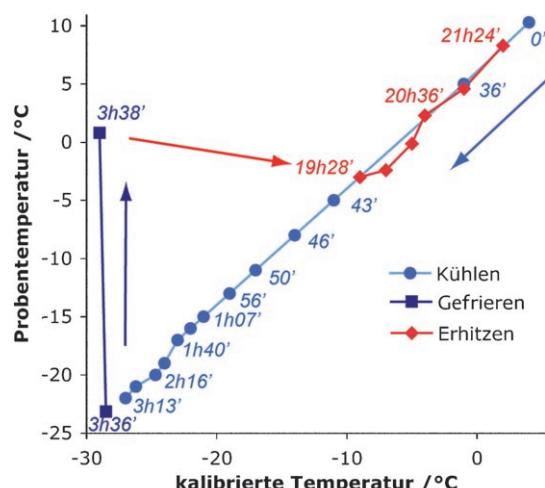


Abbildung 1. Temperatur einer mikrokristallinen Probe von Crh-Protein während eines Gefrier-Auftau-Zyklus. Die Probentemperatur (anhand der Wasser-Resonanzfrequenz bestimmt) ist gegen die mit dem chemischen Verschiebungsthermometer $\text{Sm}_2\text{Sn}_2\text{O}$, anhand des ^{19}Sn -NMR-Signals kalibrierte Temperatur aufgetragen.^[16] An den Punkten, an denen sich die Probe im thermodynamischen Gleichgewicht befindet, ist eine Temperaturdifferenz von ungefähr 5 K zu erkennen. Die Differenz resultiert vermutlich daher, dass die Kalibrierung mit einem anderen Rotor, der eine andere Reibungswärme erzeugt, durchgeführt werden muss. Blaue Punkte kennzeichnen Signale, die beim Abkühlen aufgenommen wurden, dunkelblaue Punkte kennzeichnen das Gefrieren der Probe, und rote Punkte kennzeichnen Signale, die beim Aufheizen der Probe aufgenommen wurden. Erwartungsgemäß sinkt die Probentemperatur mit sinkender Umgebungstemperatur. Die Wasser-Resonanzfrequenz (blaue Punkte) in den Spektren verschiebt sich zu tieferem Feld (die zugehörigen Spektren sind in Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen gezeigt) und erreicht eine chemische Verschiebung von 5.21 ppm, was eine Probentemperatur von etwa -21°C anzeigt (siehe *Experimentelles*). Ein weiteres Absenken der kalibrierten Temperatur um 1 K führt zu einem plötzlichen Anstieg der Probentemperatur auf ungefähr 0°C , was die Eisbildung anzeigt. Bei weiterem Abkühlen sinkt die Intensität der Wasser-Resonanz, die aber bei der gleichen chemischen Verschiebung bleibt (Abbildung S1). Beim Aufheizen (rote Punkte) kann die Probentemperatur bis zum Schmelzen nicht anhand der chemischen Verschiebung bestimmt werden.

$6 \times \text{His-Tag}$), die wegen der langsameren Moleküldynamik bei tieferen Temperaturen, die den Polarisationstransfer durch Kreuzpolarisation (CP) begünstigen, zunächst an Intensität gewinnen. Die meisten positiven Signale sind eindeutig auf chemischen Austausch zurückzuführen (Abbildung 2 b, links).^[8,11,12] Eine gewisse Signalintensität wird auch bei Frequenzen gefunden, wo sich keine Resonanzen von Kohlenstoffkernen mit benachbarten schnell austauschenden Protonen befinden. Diese Signale resultieren aus dem Polarisationstransfer durch Protonenspindiffusion (Abbildung 2 b, Mitte).

Bei -20°C stammen die stärksten positiven Signale von den Kohlenstoffkernen der Histidin-Seitenketten. Es wurde nachgewiesen, dass die Protonen der Histidin-Seitenketten sehr schnell austauschen^[19a] ($> 100\,000 \text{ s}^{-1}$ bei Raumtemperatur in Ubiquitin^[19b]). Dies erklärt die Anwesenheit der zugehörigen Signale in den Spektren bei -20°C . Lysine zeigen einen um eine Größenordnung langsameren Austausch von ca. $10\,000 \text{ s}^{-1}$ bei Raumtemperatur (in Ubiquitin^[20]), extra-

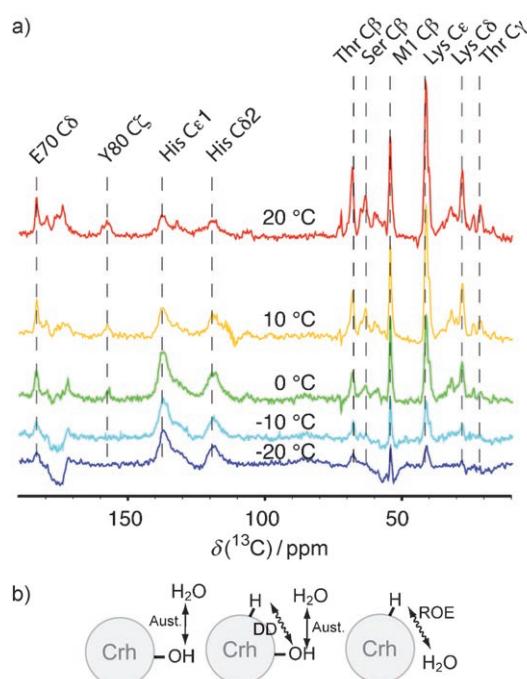


Abbildung 2. a) ω_2 -Zeilen auf der Wasser-Frequenz, extrahiert aus konventionellen HETCOR-Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen. Eine CP-Kontaktzeit von 2 ms und eine Rotationsgeschwindigkeit von 9 kHz wurden gewählt. Die angegebenen Temperaturen entsprechen den Probentemperaturen, so wie sie anhand der chemischen Verschiebung des Wassers bestimmt wurden (siehe *Experimentelles*). Die Pulssequenz des HETCOR-Experiments und die resultierenden 2D-Spektren sind in den Hintergrundinformationen gezeigt (Abbildungen S2a bzw. S3). b) Unterschiedliche Modelle des Polarisationstransfers, die den Spektren in (a) zugrundeliegen.

polierbar auf ca. 1000 s^{-1} bei -20°C). Dies stützt unsere Beobachtung, dass die His- und einige Lys-Reste bei -20°C immer noch Austauschsignale innerhalb von ein paar Millisekunden zeigen. Dass die in den Spektren beobachteten positiven Kreuzsignale mit sinkender Temperatur nach und nach verschwinden, identifiziert sie eindeutig als aus chemischem Austausch resultierende Signale.

Die Spektren in Abbildung 2 zeigen noch eine weitere interessante Eigenschaft. Mit dem Verschwinden der Wasser-Protein-Austauschsignale treten bei sinkender Temperatur negative Kreuzsignale auf, und bei -20°C sind eindeutig negative Kreuzsignale in den CO- und Ca-Regionen des Spektrums zu sehen. Dieses Muster erinnert stark an ähnliche Beobachtungen in ROESY-NMR-Spektren in flüssiger Phase (Abbildung 2 b, rechts). Und zwar führt in solchen Spektren, in denen der Polarisationstransfer während einer Spinlock-Periode erreicht wird, der Transfer durch das rotierende Bezugssystem NOE (ROE) zu negativen Kreuzsignalen, während Signale aus chemischem Austausch immer positiv sind. Bei -20°C wird die Mehrheit der ^{13}C -Resonanzen invertiert, außer solchen, die von Kohlenstoffkernen in der Nachbarschaft von austauschenden Protonen stammen. Dies deutet darauf hin, dass ROE-Effekte mit Wasser entweder auf eine nicht-ortspezifische Art auftreten können oder durch Spin-diffusion weitergegeben werden.

Um die Beobachtungen der ROE-Wechselwirkungen zu bestätigen, haben wir ROESY-HETCOR-Experimente durchgeführt, die vor dem CP-Schritt eine Protonen-Spinlock-Periode enthalten (die Pulssequenz ist in Abbildung S2b gezeigt). Abbildung 3a zeigt die Schnitte an der Wasser-Frequenz in ω_1 , die aus einem 2D-Spektrum entnommen wurden, das bei -18°C mit unterschiedlichen Spinlock-Perioden aufgenommen wurde (Abbildung S4). Die Ähnlichkeit mit den Schnitten in Abbildung 2 bei niedrigen Temperaturen bestätigt, dass die negativen Signale aus einem Polarisationsaustausch während der Protonen-Spinlock-Periode stammen.

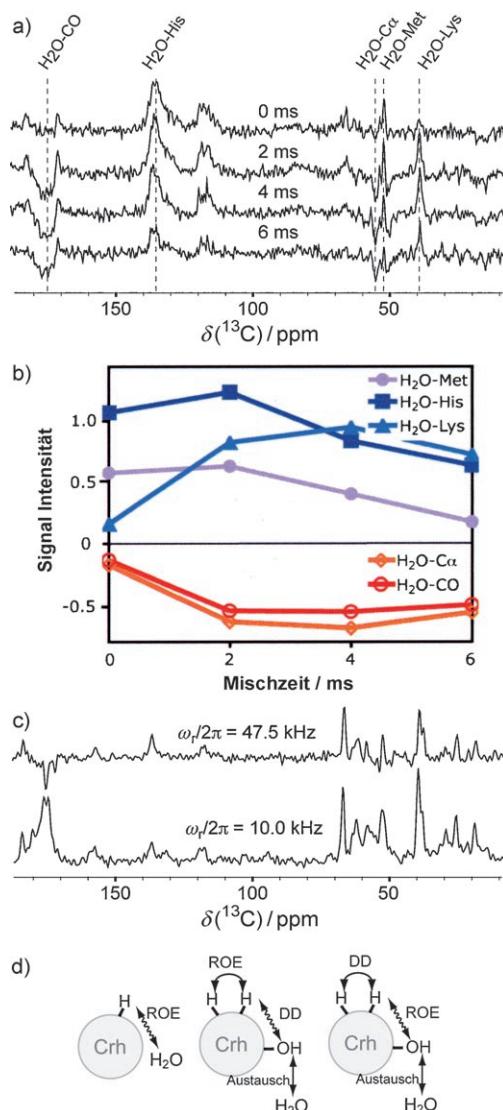


Abbildung 3. a) ω_2 -Zeile auf der Wasser-Frequenz, extrahiert aus einem konventionellen ROESY-HETCOR-Spektrum, aufgenommen bei -18°C Probentemperatur bei unterschiedlichen Spinlock-Perioden. Die Pulssequenz des ROESY-HETCOR-Experiments und die 2D-Spektren sind in Abbildung S2b bzw. S4 gezeigt. b) Aufbaukurven der positiven Signale von Kohlenstoffkernen nahe austauschender Protonen (Met1-C α , His-C ϵ 1, Lys-C ϵ ; blau) und der negativen Signale, die intermolekulare ROEs anzeigen, für die Resonanzen der Carbonyl- und der C α -Region. c) ROESY-HETCOR-Spektren, aufgenommen bei zwei Rotationsgeschwindigkeiten bei 10°C Probentemperatur. d) Mögliche Wasser-Protein-Polarisationstransferwege.

Abbildung 3b zeigt den Polarisationsaufbau als Funktion der Mischzeit. Die Intensität ungleich null des Signals bei verschwindender Mischzeit stammt von ROE und chemischem Austausch während der CP. Negative Signale zeigen die gleiche Entwicklung in der Carbonyl- und in der aliphatischen Region, mit einem Minimum bei ungefähr 4 ms. Positive Signale zeigen unterschiedliches Verhalten, was die verschiedenen Austauschgeschwindigkeiten der austauschenden Protonen widerspiegelt.

Die Beobachtung negativer Signale deutet auf einen Proton-Proton-Magnetisierungstransfer durch ROE hin. Dies kann entweder ein direkter ROE-Polarisationstransfer von Wasser-Protonen zu Protein-Protonen sein (Abbildung 3d, links), oder ein intramolekularer ROE-Polarisationstransfer von einem schnell austauschenden Proton zu einem anderen Protein-Proton (austauschbasierter Transfer, Abbildung 3d, Mitte). Der zweite Mechanismus ist allerdings nur effizient, wenn die Schwankungen der dipolaren Wechselwirkungen mit einem nahen Spin, die von interner Bewegung stammen, so ausgeprägt sind, dass sie zu einem dominanten Mechanismus werden.^[21,22] Letztendlich könnten durch chemischen Austausch weitergegebene ROE-Signale auch durch Spindiffusion an die restlichen Protein-Protonen weitergegeben werden (Abbildung 3d, rechts). Ein Beitrag aus direkter Spindiffusion von einer immobilen Wasserschicht zum Protein scheint unwahrscheinlich, da es unter ähnlichen Bedingungen nicht möglich war, Doppelquantenkohärenz zwischen Wasser- und Proteinprotonen zu erzeugen,^[12] kann aber nicht strikt ausgeschlossen werden.

Diejenigen Wege, die Spindiffusion einschließen (Austausch-Spindiffusion oder Austausch-ROE-Spindiffusion), sollten bei höheren Rotationsfrequenzen weniger effizient sein. Wir nahmen daher ROESY-HETCOR-Spektren bei zwei unterschiedlichen Rotationsfrequenzen auf (10 und 47.5 kHz), mit einer Spinlock-Zeit von 6.25 ms und bei einer Temperatur von 10°C . Die erhaltenen Schnitte auf der Wasser-Frequenz sind in Abbildung 3c gezeigt. Bei schneller Rotation können eindeutig negative Signale in der Carbonyl- und C α -Region beobachtet werden, während die entsprechenden Signale bei langsamer Rotation, bei sonst gleichen experimentellen Bedingungen, positiv sind. Wir schließen daraus, dass bei einer MAS-Frequenz von 10 kHz das Spektrum von chemischem Austausch, der durch Spindiffusion weitergegeben wird, dominiert wird. Der ROE-Polarisationstransfer wird durch den Polarisationstransfer maskiert, der durch schnelle Spindiffusion von den austauschenden Protonen weitergegeben wird. Daher kann man bei niedrigen Rotationsfrequenzen negative Kreuzsignale nur bei niedrigen Temperaturen beobachten, wo chemischer Austausch und hieraus resultierende Transfers weniger effizient sind. Bei schnellerem MAS wird die Protonen-Spindiffusion verlangsamt, und die Austausch-Spindiffusion wird weniger effizient als der ROE-Transfer. Daher erscheinen negative Kreuzsignale. Anstatt durch MAS kann die Spindiffusion auch durch Verwendung eines Spinlocks im magischen Winkel (z.B. durch homonukleare Entkopplung; e-DUMBO) verlangsamt werden. Unter diesen Bedingungen zeigt sich in den Spektren das gleiche Muster negativer Kreuzsignale. Dies bestätigt, dass die Spindiffusion gegenüber dem direkten Polarisati-

ontransfer an Bedeutung verliert (Einzelheiten siehe Hintergrundinformationen).

Zusammenfassend haben wir gezeigt, dass für das Crh-Protein die dominanten Signale an der Wasser-Frequenz in ^1H - ^{13}C -HETCOR-Spektren vom chemischen Austausch zwischen den Seitenketten-Protonen und dem Wasser stammen. Der Austauschprozess wird durch Absenken der Temperatur verlangsamt. Die Polarisation kann dann durch Spindiffusion zu anderen Protein-Protonen weitergegeben werden. Dieser Weg ist unter schnellem MAS weniger effizient. Auch in festen Proteinen sind Wasser-Protein-ROEs detektierbar, auch wenn die Signale schwächer sind als solche, die aus chemischem Austausch resultieren. Des Weiteren beleuchten unsere Studien die verschiedenen Ursprünge des Polarisationstransfers zwischen Wasser- und Protein-Protonen in festen Proteinen. Die Ergebnisse können als Grundlage für ähnliche Untersuchungen an nichtkristallinen Proben dienen, z.B. amyloiden Fibrillen oder Proteinen des Zytoskeletts. Darüber hinaus sind unsere Untersuchungen von Bedeutung für die Entwicklung neuer Pulssequenzen mit einer besseren Handhabung des Wassers für Festkörper-NMR-Experimente, wie z.B. Techniken der Wasserunterdrückung und der Protonendetektion.

Experimentelles

Probenbereitung: Crh wurde wie in Lit. [23] beschrieben überexprimiert. Die *E.coli*-Bakterien wurden in >98% ^2H -, ^{13}C -, ^{15}N -markiertem Medium (Silantes) gezüchtet. Austauschbare Protonen wurden unter denaturierenden Bedingungen (8M Guanidiniumchlorid) zurückgetauscht. Das Protein wurde in einer Kristallisierplatte über einer 2M NaCl-Lösung mit 20% PEG 6000 als Fällungsmittel kristallisiert.^[18] Die das Protein enthaltende Lösung wies den pH-Wert 7 auf. Der Rotor wurde mit Mikrokristallen gefüllt, die sich aus ungefähr 8 mg Protein ergaben. Das Protein zeigt Restprotonierung, vorwiegend an Methylgruppen. Die Proteinprobe für die Experimente mit schneller Probenrotation wurde in (^2H , ^{13}C , ^{15}N)-S9-Medium (Spectra Stable Isotopes) exprimiert und zeigt einen höheren Deuterierungsgrad als die oben beschriebene Probe. Die Probe wurde in einen 1.8-mm-Rotor gefüllt.

Temperaturkalibrierung: Die Position des H_2O -Protonensignals ist stark temperaturabhängig, sodass die chemische Verschiebung der Wasser-Resonanz verwendet werden kann, um die Probentemperatur zu messen. Die externe Referenzierung auf DSS (2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure), das die chemische Verschiebung von null anzeigt, ermöglicht die Berechnung der Temperatur anhand der Beziehung $\delta(\text{H}_2\text{O}) = 7.83 - T/96.9 \text{ ppm}$, wobei die Temperatur in Kelvin gemessen wird.^[24]

NMR-Spektroskopie: Verwendete Spektrometer: Bruker Avance DSX 700 MHz, ausgestattet mit einer Doppelresonanz-4-mm-MAS-Sonde; Varian Infinity + 500 MHz, ausgestattet mit einer Doppelresonanz-1.8-mm-MAS-Sonde (angefertigt von A. Samoson

und J. Past, Tallinn). Die detaillierten Experimente sind in den Hintergrundinformationen beschrieben.

Eingegangen am 7. März 2008
Online veröffentlicht am 4. Juli 2008

Stichwörter: Chemischer Austausch · Kern-Overhauser-Effekt · NMR-Spektroskopie · Proteine · Wasser

- [1] E. M. Haacke, R. W. Brown, M. R. Thompson, R. Venkatesan, *Magnetic Resonance Imaging: Physical Principles and Sequence Design*, Wiley, New York, **1999**.
- [2] P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry, R. B. Lauffer, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2293.
- [3] G. Otting, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1997**, *31*, 259.
- [4] B. Halle, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **2004**, *359*, 1207.
- [5] A. Böckmann, E. Guittet, *FEBS Lett.* **1997**, *418*, 127.
- [6] A. Böckmann, F. Penin, E. Guittet, *FEBS Lett.* **1996**, *383*, 191.
- [7] K. Modig, E. Liepinsh, G. Otting, B. Halle, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 102.
- [8] A. Lesage, A. Böckmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13336.
- [9] E. K. Paulson, C. R. Morcombe, V. Gaponenko, B. Dancheck, R. A. Byrd, K. W. Zilm, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14222.
- [10] V. Chevelkov, K. Faelber, A. Diehl, U. Heinemann, H. Oschkinat, B. Reif, *J. Biomol. NMR* **2005**, *31*, 295.
- [11] A. Böckmann, M. Juy, E. Bettler, L. Emsley, A. Galinier, F. Penin, A. Lesage, *J. Biomol. NMR* **2005**, *32*, 195.
- [12] A. Lesage, L. Emsley, F. Penin, A. Böckmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8246.
- [13] R. W. Martin, K. W. Zilm, J. D. Gehman, E. K. Paulson, C. R. Morcombe, *J. Magn. Reson.* **2003**, *165*, 162.
- [14] W. T. Franks, D. H. Zhou, B. J. Wylie, B. G. Money, D. T. Graesser, H. L. Frericks, G. Sahota, C. M. Rienstra, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12291.
- [15] B. Zobrist, U. Weers, T. Koop, *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 10254.
- [16] G.-J. M. P. van Moorsel, E. R. H. van Eck, C. P. Grey, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1995**, *159*.
- [17] A. Lesage, L. Emsley, F. Penin, A. Böckmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8246.
- [18] 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.
- [19] a) E. Liepinsh, G. Otting, *Magn. Reson. Med.* **1996**, *35*, 30; b) P. Pelupessy, persönliche Mitteilung.
- [20] T. Segawa, F. Kateb, L. Duma, G. Bodenhausen, P. Pelupessy, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 537–542.
- [21] K. Takegoshi, T. Terao, *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 1700.
- [22] N. Giraud, J. Sein, G. Pintacuda, A. Böckmann, A. Lesage, M. Blackledge, L. Emsley, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12398.
- [23] A. Galinier, J. Haiech, M. C. Kilhoffer, M. Jaquinod, J. Stulke, J. Deutscher, I. Martin-Verstraete, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 8439.
- [24] J. Cavanagh, W. J. Fairbrother, A. G. Palmer III, N. J. Skelton, *Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice*, Elsevier, Amsterdam, **1996**.