

Der Einsatz von Relaxationserhöhungen in einer paramagnetischen Umgebung zur Proteinstrukturbestimmung mit NMR-Spektroskopie**

Tobias Madl, Wolfgang Bermel und Klaus Zanger*

Die NMR-Spektroskopie hat sich zu einer grundlegenden Methode der Strukturbioologie entwickelt, mit der nicht nur Strukturen, sondern auch dynamische Aspekte von biologischen Makromolekülen untersucht werden können. Durch Entwicklungen auf dem Gebiet der Methoden (z.B. transverse relaxation-optimized spectroscopy (TROSY)^[1]), dipolare Restkopplungen (RDCs^[2,3]), Deuterierung,^[4] stereoarray isotope labeling (SAIL^[5]), Methyl-TROSY^[6] und direkte ¹³C-Detektion^[7-9]) konnte das Größenlimit für NMRspektroskopisch in Lösung analysierbare Proteine in den letzten 10 Jahren angehoben werden. Jedoch ist die Zahl an Strukturen für Proteine über 30 kDa, die NMR-spektroskopisch gelöst wurden, noch immer recht gering. Trotz des Einsatzes alternativer strukturrelevanter Parameter beruht die aktuelle Strukturbestimmung noch immer hauptsächlich auf der Verwendung einer großen Zahl an NOEs. Mit zunehmender Molekülgröße steht aber nur mehr eine geringe Zahl an Proton-Proton-Abständen zur Verfügung, da dann eine teilweise oder vollständige Deuterierung eingesetzt werden muss, um die NMR-Signale durch Verdünnung der Protonen schärfer zu machen.^[10] Um eine Strukturbestimmung durch NMR-Spektroskopie in Lösung auch für solche Systeme zu ermöglichen, müssen die NOE-Daten durch andere strukturrelevante Parameter ergänzt werden, zum Beispiel durch paramagnetische Relaxationserhöhungen (paramagnetic relaxation enhancements, PREs) und Pseudokontakt-Verschiebungen (pseudo contact shifts, PCSSs), die durch kovalent gebundene paramagnetische Gruppen oder Metallzentren in Proteinen induziert werden.^[11-17] Jedoch ist

die Herstellung von Proteinen mit paramagnetischen Gruppen aufwendig, da sie die Einführung von Cysteinresten an mehreren Positionen sowie deren chemische Modifizierung erforderlich macht. Dabei können Strukturänderungen durch Mutation von Cysteinresten sowie durch die chemischen Veränderungen nicht ausgeschlossen werden. Weiterhin sind die Signale von Aminosäuren in der Nähe der paramagnetischen Gruppen extrem verbreitert.

Hier präsentieren wir einen neuen Weg zur Strukturbestimmung von biologischen Makromolekülen durch die Effekte von inerten und frei löslichen paramagnetischen Agentien. Derartige Verbindungen benötigen keine (bio)chemische Modifikation des Makromoleküls und ermöglichen eine Relaxationserhöhung, die einfach durch Variieren der Konzentration steuerbar ist. Für unsere Studien nutzten wir den wasserlöslichen Komplex Gadolinium-diethylaminopentaessigsäure-bismethylamid, [Gd(dtpabma)], der inert gegenüber Proteinen ist und nicht in diese eindringen kann.^[18-20] Dadurch wird quasi das Lösungsmittel um das Protein paramagnetisch gemacht. Paramagnetische Lösungsmittelzusätze wie Gadoliniumkomplexe, stabile Nitroxylradikale oder Sauerstoff wurden bereits genutzt, um Proteinoberflächen und Protein-Protein-Wechselwirkungen zu untersuchen.^[21-23]

Die vereinte Relaxationserhöhung eines bestimmten Kerns ist eine Kombination der Einflüsse der gesamtem paramagnetischen Umgebung. Wie hier gezeigt, kann diese strukturrelevante Information in einer alternativen Strukturbestimmungsmethode eingesetzt werden. Sie liefert einen steuerbaren Parameter, der von der Eindringtiefe im Protein abhängt.

Die Wechselwirkung zwischen einem NMR-aktiven Kern und einem inertem paramagnetischen Molekül kann durch das „Wechselwirkungsmodell zweiter Ordnung“^[19] beschrieben werden. In diesem Formalismus ist die Relaxationserhöhung einer paramagnetischen Gruppe gegeben durch eine $1/r^6$ -Abhängigkeit wobei r der Abstand zwischen dem paramagnetischen Zentrum und dem untersuchten Kern ist. Für eine ebene Oberfläche, und in guter Näherung für große sphärische Systeme, ergibt die Integration über die gesamte paramagnetische Umgebung eine $1/d^3$ -Funktion, wobei d die Entfernung zur Oberfläche ist.^[20] Wenn nur ein paramagnetisches Molekül nahe zu einem bestimmten Kern ist (in der Nähe einer Eindellung eines Proteins, in die nur ein [Gd(dtpabma)]-Molekül passt) gehorcht die Relaxationserhöhung der $1/r^6$ -Funktion. Daher muss die Abhängigkeit eines PREs von der Eindringtiefe zwischen einer $\langle d^{-3} \rangle$ - und $\langle d^{-6} \rangle$ -Funktion liegen.

Da a priori die Struktur und Form des untersuchten Proteins unbekannt ist, kann keine exakte mathematische

[*] Dr. T. Madl, Prof. K. Zanger

Institut für Chemie, Organische und Bioorganische Chemie
Karl-Franzens-Universität Graz
Heinrichstrasse 28, 8010 Graz (Österreich)
Fax: (+43) 316-380-9840
E-Mail: klaus.zanger@uni-graz.at

Dr. W. Bermel

Bruker BioSpin GmbH
Silberstreifen 4, 76287 Rheinstetten (Deutschland)

[†] Aktuelle Adresse: Münchner Zentrum für Integrierte Protein-Wissenschaften und Biomolekulare NMR
Department Chemie, TU München (Deutschland)

[**] Wir danken sehr herzlich dem Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF) für die finanzielle Unterstützung (Projekt Nr. 19902 von K.Z.). T.M. bedankt sich bei der Österreichischen Akademie der Wissenschaften (ÖAW) für ein DOC-Stipendium. Ein weiteres Dankeschön geht an Michael Sattler und Bernd Simon, TU München, für wertvolle Diskussionen und an Jean-Marie Clement, Institut Pasteur, Paris, für das MBP-Plasmid.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200902561> zu finden.

Beschreibung der Relaxation für einen bestimmten Kern abgeleitet werden, und wir nutzen einen konservativen, modellfreien Algorithmus. Für eine gemessene PRE kann der Abstand zwischen dem Kern und dem nächsten paramagnetischen Zentrum nur größer oder gleich demjenigen für eine Relaxationserhöhung sein, die durch ein einzelnes paramagnetisches Molekül in einer Entfernung (k/PRE)⁻⁶ erzeugt werden würde. Ohne die Struktur zu kennen, kann die Konstante k aus den maximalen PREs von nicht austauschenden Protonen (gebunden an Kohlenstoff) erhalten werden. Diese Protonen liegen an der Oberfläche des Proteins. Der kürzestmögliche Abstand zwischen einem Proton an der Oberfläche und einem paramagnetischen Zentrum ist 5.9 Å – entsprechend der Summe aus dem Radius von [Gd(dtpa-bma)] (3.5 Å) plus zweimal dem Van-der-Waals-Radius von Wasserstoff. Weiterhin kann man davon ausgehen, dass Protonen mit den höchsten PREs an der Proteinoberfläche lokalisiert sind. Die zur Verfügung stehenden Daten sind also 1) Informationen darüber, welche Atome die höchsten PREs liefern und daher an der Oberfläche liegen, und 2) die Minimalabstände der anderen abgeschirmten Kerne von den paramagnetischen Zentren.

Standard-NMR-Experimente können leicht durch Einführung eines „Saturation“- oder „Inversion-recovery“-Blocks zu Beginn der Pulssequenz für die Messung der PREs adaptiert werden. Vorzugsweise nutzen wir „Saturation“, da hierbei die Magnetisierung zu Beginn der Pulssequenz nicht im Gleichgewicht sein muss (im Unterschied zu einem „Inversion-recovery“- oder Spinecho-Experiment). Aus diesem Grund kann die Zeit zwischen zwei Aufnahmen deutlich verkürzt werden. Aufgrund dieser höheren Wiederholraten der Spektrenaufnahme und da T_1 -Zeiten länger sind als T_2 , was zu größerer Präzision bei der Messung kleinerer Relaxationserhöhungen führt, nutzen wir longitudinale Relaxationsraten. Ubiquitin (8 kDa) und das Maltose-bindende Protein (MBP; 42 kDa) wurden als Modellsysteme für die vorgeschlagene Methode ausgewählt, da beide sowohl mit Hilfe von Röntgenkristallographie als auch NMR-spektroskopisch untersucht wurden.^[24–27] Während Ubiquitin als Fallbeispiel für eine schnelle Strukturbestimmung dient, wurde MBP gewählt, um zu zeigen, dass PREs besonders bei der Analyse großer Proteine Vorteile bieten.

Für diese Studie nutzten wir HSQC-Spektren (^{13}C - ^1H und ^{15}N - ^1H), um Protonen-PREs zu messen. Durch Zugabe von [Gd(dtpa-bma)] sind die Signale aufgrund schnellerer T_2 -Relaxation verbreitert. Jedoch ist die Auflösung der Spektren noch immer hoch genug, um die Auswertung einer großen Zahl an PREs zu ermöglichen (Abbildung 1).

Für das größere MBP wurden zusätzliche Informationen über die Lokalisierung von Kohlenstoffkernen aus Experimenten mit direkter ^{13}C -Detektion gewonnen.^[7–9] Im ersten Schritt der Strukturrechnung wurden Pseudomoleküle rund um die Ausgangsstruktur platziert, um die paramagnetische Umgebung zu simulieren. Diese Ausgangsstruktur, die bereits globuläre Form hatte, wurde nur mit NOEs zwischen austauschenden Protonen (Amidprotonen) gewonnen und war typischerweise weit entfernt von der endgültigen Struktur. Die Wolke aus Pseudomolekülen wurde dann mit der Proteinoberfläche, durch Definieren von Abständen zwischen

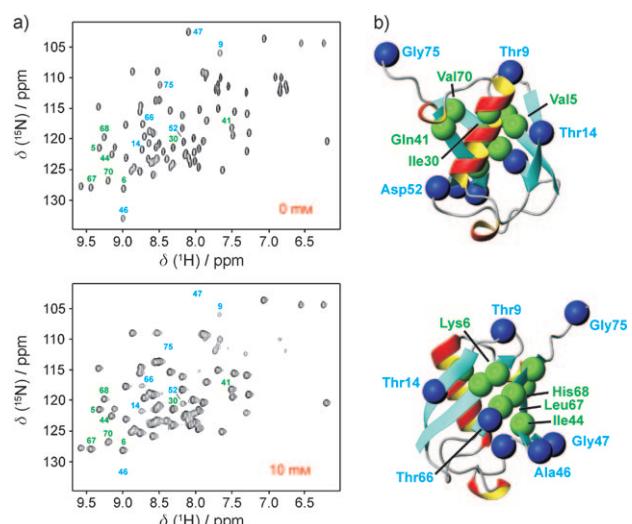


Abbildung 1. a) ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektren von Ubiquitin bei [Gd(dtpa-bma)]-Konzentrationen von 0 und 10 mM. b) In der Darstellung von Ubiquitin sind Aminosäure-NH-Protonen mit hohen PREs als blaue Kugeln und vom paramagnetischen Lösungsmittelzusatz abgewandte Aminosäure-NH-Protonen (mit kleineren PREs) als grüne Kugeln eingezeichnet.

Kernen, die die höchsten PREs zeigen, mit Pseudomolekülen verbunden. Für die anderen Spins mit niedrigeren Relaxationserhöhungen wurden die Minimalabstände zum nächstgelegenen Pseudomolekül definiert. Mit diesem Satz an strukturrelevanten Information wurde eine Strukturrechnung mit „simulated annealing“ gestartet. In der daraus resultierenden Struktur wurden dann Abstände zwischen Proteinatomen und Pseudomolekülen gesucht, die kleiner waren als die definierten Minimalabstände basierend auf den gemessenen PREs. Für jede derartige Verletzung wurden dann zusätzliche Minimalabstände definiert, um sämtliche Pseudomoleküle im richtigen Abstand von allen Kernen, für die experimentelle PREs verfügbar sind, zu halten. Aufgrund der relativ hohen Zahl an Minimalabständen beobachteten wir keine Pseudomoleküle, die im Protein gefangen waren. Nachfolgend wird die Strukturrechnung unter Einbeziehung der zusätzlich definierten Abstände wiederholt. Dieser iterative Prozess wird wiederholt, bis keine neuen Verletzungen mehr auftreten. Theoretisch wäre es möglich, zu Beginn einer Strukturrechnung Abstände zwischen jedem Atom und jedem Pseudomolekül zu definieren. Das würde jedoch sogar für kleine Proteine eine unüberschaubare Zahl an Parametern liefern. Zum Beispiel nutzten wir 380 Pseudomoleküle für Ubiquitin. Die gemessenen 205 PREs würden demnach 77 900 Abstände ergeben (205×380). Aus diesem Grund starten wir mit nur einem Abstand pro Kern und führen zusätzliche nur ein, wenn ein Pseudomolekül während der Strukturrechnung zu nahe kommt.

Bei allen Rechnungen wurden von den verfügbaren NOEs nur solche zwischen austauschenden Protonen genutzt, und zwar aus zwei Gründen: Der drastisch reduzierte Datensatz an NOEs repräsentiert 1) eine typische Situation für vollständig deuterierte Proteine und stellt 2) einen unvorgenommenen Satz an Abstandsinformationen dar, an

welchem die Auswirkung der PREs an einem System mit geringer Zahl an strukturelevanten Informationen gezeigt werden kann. Der Einsatz des oben beschriebenen Algorithmus führte unter Verwendung von nur 49 NOEs zwischen NH-Protonen zu einer PRE-Struktur von Ubiquitin mit einer mittleren Abweichung (rmsd) von 1.3 Å für das Proteinrückgrat (Abbildung 2). Dabei ist bemerkenswert dass nur 7 der 49 NOEs Informationen über weite Abstände (mehr als 4 Aminosäurereste dazwischen) enthalten. Die Abweichung von der Kristallstruktur^[27] beträgt 2.1 Å (rmsd für das Proteinrückgrat). Die Auswirkung der PREs auf die Präzision

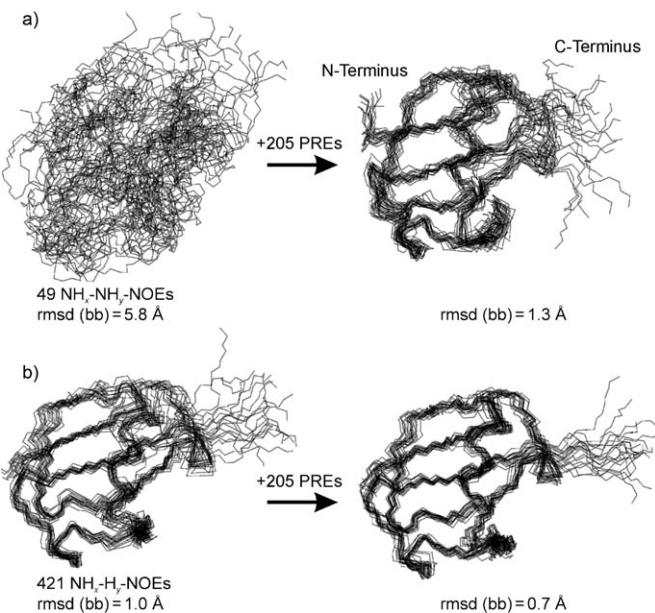


Abbildung 2. Überlagerungen der 20 energieärmsten Strukturen von Ubiquitin zeigen die Auswirkung von PREs auf die Lösungsstruktur unter Verwendung von NOEs zwischen ausschließlich austauschenden Protonen (a) und NOEs, die zumindest ein austauschendes Proton beinhalten (b).

und Genauigkeit der NMR-Strukturen verringert sich, wie erwartet, wenn man eine höhere Zahl an NOEs verwendet (siehe Tabelle 1). Aus diesem Grund sind sie bei kleinen Proteinen besonders hilfreich für eine schnelle Bestimmung der Proteinfaltung, die dann verwendet werden kann, um weitere NOEs zuzuordnen, oder auch als Grundlage für eine Röntgenkristallstrukturanalyse mithilfe von „molecular replacement“.^[28]

Um zu zeigen, dass die vorgeschlagene Methode besonders nützlich ist bei großen Proteinen, wo die NOE-Zuordnung schwieriger ist, verwendeten wir das 42 kDa große MBP. Dabei nutzten wir ausschließlich NOEs zwischen Amidprotonen (nur zwischen NH-Gruppen am Proteinrückgrat) sowie RDCs, H-Brücken und Diederwinkel zusammen mit 1248 PREs von ¹H- und ¹³C-Kernen (Abbildung 3, Tabelle 1).

Die Kristallstruktur von MBP^[26] korreliert besser mit der PRE-Struktur (rmsd für das Proteinrückgrat: 2.6 Å) als mit der rein NOE-basierten NMR-Struktur (rmsd für das Proteinrückgrat: 3.0 Å). In einigen Regionen gibt es Abweichun-

Tabelle 1: Genauigkeit und Präzision (rmsd [\AA]) der NMR-Strukturen für Ubiquitin und MBP.^[a]

Ubiquitin				
NOEs	NOEs		+ 205 PREs	
	$\langle \text{NMR} \rangle$	$\text{NMR}_{\text{mittel}}\text{-RSA}$	$\langle \text{NMR} \rangle$	$\text{NMR}_{\text{mittel}}\text{-RSA}$
49 NH-NH	5.80 (6.55)	5.70 (6.65)	1.28 (1.78)	2.05 (2.87)
421 NH-Hx	1.03 (1.74)	2.51 (2.80)	0.74 (1.19)	1.86 (2.29)
alle 1318	0.35 (0.74)	0.58 (1.09)	0.37 (0.75)	0.65 (1.19)
MBP				
NOEs, RDCs, H-Brücken, Diederwinkel			+ 1248 PREs	
NOEs	$\langle \text{NMR} \rangle$	$\text{NMR}_{\text{mittel}}\text{-RSA}$	$\langle \text{NMR} \rangle$	$\text{NMR}_{\text{mittel}}\text{-RSA}$
822 NH-NH	11.12 (11.68)	10.56 (10.89)	1.27 (1.79)	2.56 (2.87)
alle 1937	1.48 (1.77)	3.00 (3.51)	1.38 (1.87)	2.87 (3.05)

[a] Genauigkeit (paarweise rmsd eines Bündels von NMR-Strukturen) notiert als (NMR) und Präzision (rmsd der durchschnittlichen NMR-Struktur von der Kristallstruktur (RSA)). Die erste Zahl steht für das Proteinrückgrat, und diejenige in Klammern für alle Schweratome.

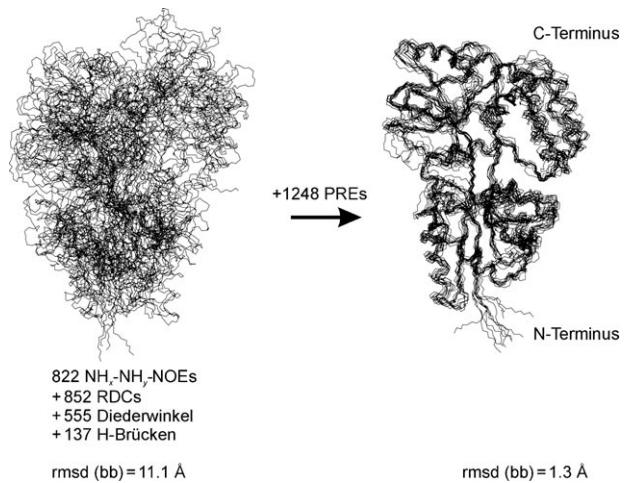


Abbildung 3. Die Überlagerung der 10 energieärmsten Strukturen von MBP zeigt die Auswirkung von PREs auf die Lösungsstruktur unter Verwendung von NOEs zwischen ausschließlich austauschenden Protonen, RDCs und Diederwinkel.

gen zwischen der PRE- und der NOE-basierten Struktur (Abbildung 4). So ist zum Beispiel ein Bereich von ca. 10 Aminosäuren (Ser233 bis Asn241) in der NOE-Struktur schlecht definiert, weil hier wenige NOEs auftreten.^[25] In der Kristallstruktur bildet dieser Bereich eine α -Helix.

In der Strukturrechnung unter Zuhilfenahme von ausschließlich PREs für die Reste 233 bis 241 entwickelte sich eine helicale Anordnung (Abbildung 4). Daher ist die Struktur in dieser Region auch in Lösung besser durch eine α -Helix definiert als durch eine flexible Kette. Andere Abweichungen zwischen der PRE- und der NOE-basierten NMR-Struktur finden sich in den relativen Orientierungen einiger Helices. Wegen der $\langle r^{-6} \rangle$ -Abhängigkeit werden PREs in Richtung kleinerer Abstände zu paramagnetischen Zentren gemittelt. Daher zeichnet sich eine offene Proteinstuktur durch hohe PREs aus. Dagegen neigen Strukturbestimmungen auf der Grundlage von NOEs zur Zuweisung kompakterer Konformationen, weil die NOEs für kurze Abstände

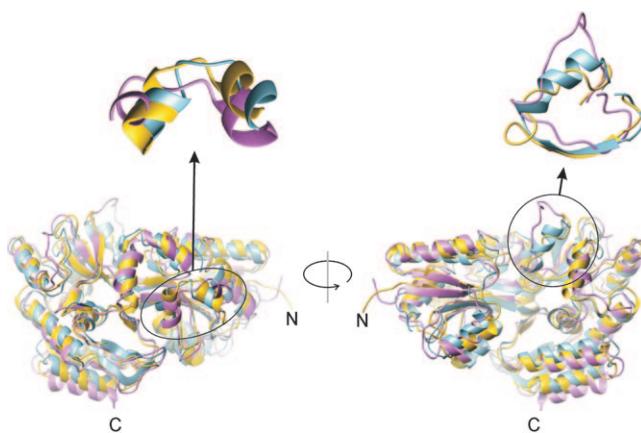


Abbildung 4. Überlagerung von Kristallstruktur (blau), NOE-basierter (rosa) und mit PREs ermittelter NMR-Struktur (gelb) des Maltose-bindenden Proteins. Regionen mit größeren Abweichungen (links: die Region zwischen Lys83 und Trp94 mit zwei α -Helices; rechts: Ser233–Asn241 mit einer α -Helix in der Kristallstruktur, aber einer flexiblen Kette in der NOE-basierten NMR-Struktur) sind hervorgehoben.

stark zunehmen. Diese Unterschiede zwischen NOEs und PREs können genutzt werden, um konformativ heterogenitäten in biologischen Makromolekülen zu detektieren. Intrinsisch ungeordnete Regionen zeigen durchgehend hohe PREs.

Aufgrund der kleineren gyromagnetischen Konstante sind die Relaxationserhöhungen für Kohlenstoffkerne wesentlich geringer als für Protonen. Dieser Effekt wurde eingesetzt, um Informationen über Kerne nahe an einem paramagnetischen Zentrum in einem Protein oder in der Nähe einer kovalent gebundenen paramagnetischen Gruppe zu erhalten.^[15] Nutzt man, so wie bei unserer Methode, einen inerten paramagnetischen Zusatz, können die Größen der PREs einfach durch Konzentrationsänderung eingestellt werden, und es gibt keine Signalauslösungen durch extreme Verbreiterungen.

Wir haben gezeigt, dass PREs von inertem paramagnetischen Lösungsmittelzusätzen es ermöglichen, die Strukturen von kleinen und mittelgroßen Proteinen nur unter Zuhilfenahme von NOEs zwischen austauschenden Protonen aufzuklären. Besonders bei größeren Molekülen ist diese Methode von Vorteil, da dort die NOE-Zuordnung schwieriger ist. Die Aufnahme und Auswertung von PREs beruht nur auf der sequenziellen Zuordnung ohne zusätzliche manuelle Datenauswertung (wie bei NOEs). Die gezeigten PRE-Strukturen konnten in einigen Tagen (Ubiquitin) oder Wochen (MBP) berechnet werden. Diese Anwendung kann für Strukturbestimmungen eine große Zeitsparnis bringen und das Größenlimit der NMR-spektroskopisch analysierbaren Proteinstrukturen anheben.

Experimentelles

[Gd(dtpa-bma)] wurde aus dem kommerziellen Kontrastmittel Omniscan erhalten wie in Lit. [20] beschrieben. Die T_1 -Relaxationszeiten für Protonen (nichtselektiv aufgenommen) wurden aus Serien von HSQC-Spektren bestimmt. Die T_1 -Relaxationszeiten für ^{13}C -Kerne

erhielten wir aus CaCO- und CON-Experimenten,^[7,8] wobei wir eine „Inversion-recovery“-Einheit zu Beginn der Pulssequenz verwendeten. Die PRE-Strukturen von Ubiquitin und MBP wurden in der PDB-Datenbank unter den Zugangsnummern 2klg (Ubiquitin) und 2klf (MBP) hinterlegt.

Eingegangen am 14. Mai 2009,
veränderte Fassung am 6. Juli 2009
Online veröffentlicht am 22. September 2009

Stichwörter: Maltose-bindendes Protein · NMR-Spektroskopie · Paramagnetische Relaxation · Proteinstrukturen · Ubiquitin

- [1] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12366.
- [2] N. Tjandra, A. Bax, *Science* **1997**, *278*, 1111.
- [3] J. R. Tolman, J. M. Flanagan, M. A. Kennedy, J. H. Prestegard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 9279.
- [4] K. H. Gardner, L. E. Kay, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, *27*, 357.
- [5] M. Kainoshio, T. Torizawa, Y. Iwashita, T. Terauchi, A. Mei Ono, P. Güntert, *Nature* **2006**, *440*, 52.
- [6] V. Tugarinov, P. M. Hwang, J. E. Hollerenshaw, L. E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10420.
- [7] W. Bermel, I. Bertini, L. Duma, I. C. Felli, L. Emsley, R. Pierattelli, P. R. Vasos, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 3149; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3089.
- [8] W. Bermel, I. Bertini, I. C. Felli, M. Piccioli, R. Pierattelli, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2006**, *48*, 25.
- [9] B. H. Oh, W. M. Westler, P. Darba, J. L. Markley, *Science* **1988**, *240*, 908.
- [10] K. H. Gardner, X. C. Zhang, K. Gehring, L. E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11738.
- [11] C. D. Barry, A. C. North, J. A. Glasel, R. J. Williams, A. V. Xavier, *Nature* **1971**, *232*, 236.
- [12] J. L. Battiste, G. Wagner, *Biochemistry* **2000**, *39*, 5355.
- [13] I. Bertini, *Concepts Magn. Reson.* **2002**, *14*, 259.
- [14] I. Bertini, C. Luchinat, G. Parigi, *Solution NMR of Paramagnetic Molecules*, Elsevier, Dordrecht, **2001**.
- [15] I. Bertini, C. Luchinat, G. Parigi, R. Pierattelli, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1536.
- [16] G. Pintacuda, M. John, X. C. Su, G. Otting, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 206.
- [17] J. Wöhner, K. J. Franz, M. Nitz, B. Imperiali, H. Schwalbe, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13338.
- [18] T. Madl, L. Van Melderen, N. Mine, M. Respondek, M. Oberer, W. Keller, L. Khatai, K. Zanger, *J. Mol. Biol.* **2006**, *364*, 170.
- [19] G. Pintacuda, G. Otting, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 372.
- [20] M. Respondek, T. Madl, C. Göbl, R. Golser, K. Zanger, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5228.
- [21] A. M. Petros, L. Mueller, K. D. Kopple, *Biochemistry* **1990**, *29*, 10041.
- [22] M. Sakakura, S. Noba, P. A. Luchette, I. Shimada, R. S. Prosser, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5826.
- [23] A. Bernini, V. Venditti, O. Spiga, N. Niccolai, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2009**, *54*, 278.
- [24] G. Cornilescu, J. L. Marquardt, M. Ottiger, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6836.
- [25] G. A. Mueller, W. Y. Choy, D. Yang, J. D. Forman-Kay, R. A. Venters, L. E. Kay, *J. Mol. Biol.* **2000**, *300*, 197.
- [26] A. J. Sharff, L. E. Rodseth, F. A. Quiocho, *Biochemistry* **1993**, *32*, 10553.
- [27] S. Vijay-Kumar, C. E. Bugg, W. J. Cook, *J. Mol. Biol.* **1987**, *194*, 531.
- [28] B. R. Szymczyna, R. E. Taurog, M. J. Young, J. C. Snyder, J. E. Johnson, J. R. Williamson, *Structure* **2009**, *17*, 499.