

Festkörper-NMR-Spektroskopie an zellulären Proben: verbesserte Empfindlichkeit durch dynamische Kernpolarisation**

Marie Renault, Shane Pawsey, Martine P. Bos, Eline J. Koers, Deepak Nand, Ria Tommassen-van Boxtel, Melanie Rosay, Jan Tommassen, Werner E. Maas und Marc Baldus*

Die Festkörper-NMR(ssNMR)-Spektroskopie bietet zunehmende Möglichkeiten, um komplexe Biomoleküle auf atomarer Ebene zu studieren (siehe z. B. Lit. [1]). Ein wichtiges Anwendungsgebiet betrifft Membranproteine, die nach Rekonstitution in synthetischen Lipiddoppelschichten ssNMR-spektroskopisch untersucht werden können. Während es solche Präparationen erlauben, funktionelle Aspekte des Zielproteins zu untersuchen, kann der Einfluss der nativen zellulären Umgebung auf Struktur und Funktion des Proteins nicht studiert werden. Wir haben vor kurzem einen allgemeinen Ansatz eingeführt, um komplexe molekulare Strukturen, einschließlich integraler Membranproteine in nativer zellulärer Umgebung durch ssNMR-Spektroskopie unter Probenrotation im magischen Winkel^[2] (MAS) zu untersuchen.^[3] Wir konnten zeigen, dass mithilfe spezieller Probenpräparationsmethoden die Aufnahme hochaufgelöster ssNMR-Spektren von einheitlich ¹³C,¹⁵N-markierten Proben vollständiger *Escherichia coli*-Zellen (ZE) sowie deren Zellhüllen (ZH) möglich ist. Deren Morphologie bleibt unter experimentellen Standardbedingungen der ssNMR-Spektroskopie erhalten, und die ¹³C- und ¹⁵N-Kreuzpolarisationssignale (CP-MAS) sind zeitlich invariant. Allerdings wird die spektroskopische Empfindlichkeit mit zunehmender Molekülkomplexität, vor allem im Fall von ZE-Proben, kritisch.

In den letzten Jahren hat sich die dynamische Kernpolarisation (DNP) zu einem Routinewerkzeug zur Empfindlichkeitserhöhung in der multidimensionalen ssNMR-Spektroskopie entwickelt.^[4] Signalverstärkungen um einen Faktor von bis zu 148 wurden an mikro/nanokristallinen Biomolekülen, wie z. B. einem amyloidogenen Peptid^[5] und einem deuterierten Protein^[6] beobachtet. Signalerhöhungen zwischen 18- und 46-fach wurden für membranständige Polypeptide,^[7] Purpurmbranen^[8] und Bakteriophagen^[8b] beschrieben.

Hier beschreiben wir die Anwendung von ssNMR-Experimenten an ¹³C,¹⁵N-markierten *E. coli*-Zellen, die PagL, ein Protein der äußeren Zellmembran,^[9] überproduziert enthalten. In Abbildung 1 vergleichen wir ¹³C- und ¹⁵N-CP-MAS-Spektren von einheitlich ¹³C,¹⁵N-markierten kompletten Zellen mit Zellhüllen, die von PagL-überproduzierenden *E. coli*-Zellen isoliert wurden. Die Daten wurden in An- und Abwesenheit der Mikrowellenstrahlung aufgenommen. Bei höherer Temperatur (271 K) offenbarten die ssNMR-Daten der Zellhülle atomare Details von PagL und endogenen membranständigen Makromolekülen wie dem Hauptlipoprotein Lpp sowie von nicht-proteinhaltigen Komponenten wie Lipopolysacchariden (LPS), Peptidoglycan (PG) und Phospholipiden.^[3] Bei tiefer Temperatur und DNP-Bedingungen beobachteten wir für beide Präparationen eine si-

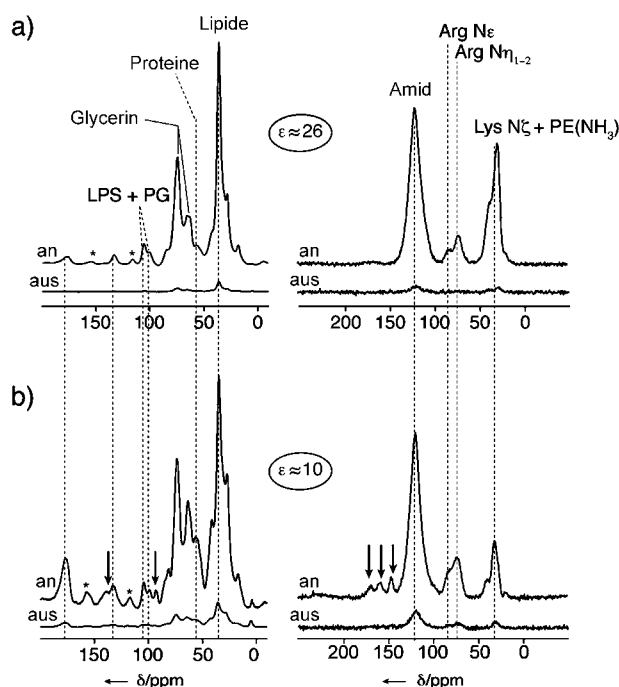


Abbildung 1. Vergleich von ¹³C- (links) und ¹⁵N-CP-MAS-Spektren (rechts) an (¹³C,¹⁵N)-markierten ZHs (a) und ZEs (b) mit „an“, oben) und ohne „aus“, unten) DNP, mit einer Mikrowellenbestrahlungszeit von 10 s. Signifikante spektrale Unterschiede zwischen den Proben sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Sternchen stehen für MAS-Seitenbanden, und Zuordnungen der molekularen Hauptkomponenten von *E. coli* sind, falls verfügbar, zusammen mit Signalverstärkungsfaktoren ϵ angegeben. In den ¹³C-CP-Spektren der ZE- und ZH-Präparationen sind ¹³C-Signale entsprechend der natürlichen Häufigkeit von Glycerin ($\delta^{13}\text{C} \approx 73$ und 63 ppm) sichtbar, welches in der glasartigen Matrix vorliegt und aus dem Siliconstopfen ($\delta^{13}\text{C} \approx 4$ ppm) stammt.

[*] Dr. M. Renault, E. J. Koers, Dr. D. Nand, Prof. M. Baldus
Bijvoet Center for Biomolecular Research, Utrecht University
Padualaan 8, 3584 CH Utrecht (Niederlande)
E-Mail: m.baldus@uu.nl

Dr. M. P. Bos, R. Tommassen-van Boxtel, Prof. J. Tommassen
Department of Molecular Microbiology, Utrecht University
Padualaan 8, 3584 CH Utrecht (Niederlande)

Dr. S. Pawsey, Dr. M. Rosay, Dr. W. E. Maas
Bruker BioSpin Corp., Billerica, MA 01821 (USA)

[**] Teile dieser Arbeit wurden auf der 52. ENC-Konferenz (Asilomar, CA, 10.–15. April 2011) präsentiert. Wir danken der NWO (Zeichen 700.26.121 und 815.02.012) und dem FP7-EU-Programm (FP7/2007-2013; Zeichen 211800) für finanzielle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201105984> zu finden.

gnifikante DNP-Signalverstärkung in typischen spektralen Bereichen für Proteinsignale (aliphatische ^{13}C -Resonanzen: $\delta = 50\text{--}55$ ppm, Amid- ^{15}N -Rückgrat und Seitenkettenresonanzen bei $\delta = 120$ und $30\text{--}80$ ppm) und für ^{13}C -Signale von endogenen Phospholipiden, PG und LPS, die bei $\delta = 34$, $92\text{--}103$ bzw. $95\text{--}104$ ppm liegen.

Wir fanden vergleichbare DNP-Verstärkungsfaktoren für Glycerinsignale ($\delta^{13}\text{C} = 63$ und 73 ppm), die Teil der glasartigen Matrix sind. Die Signale konnten durch dipolare (^{13}C , ^{13}C)-Doppelquanten (siehe Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen) und 2D-(^{15}N , ^{13}C)-Spektroskopie (Abbildung S2) unterdrückt werden. Diese Daten bestätigten auch die Anwesenheit der molekularen Hauptbestandteile der Zellmembran, d. h. von LPS, PG und Phosphatidylethanolamin (PE). Wir beobachteten außerdem einen Satz neuer ZE-Signale bei $\delta = 92$ ppm und 138.4 ppm in ^{13}C - bzw. 146.0 ppm, 158.5 ppm und 169.7 ppm in ^{15}N -CP-Spektren (Pfeile in Abbildung 1b).

Um den Ursprung dieser Signale zu verstehen, führten wir eine Reihe von heteronuklearen 2D-ssNMR-Messungen an einheitlich ^{13}C , ^{15}N -markierten ZE-Proben durch. Das heteronukleare 2D-(^1H , ^{15}N)-Korrelationsspektrum (Abbildung 2a) zeigte intensive Korrelationen zwischen ^{15}N -Signalen bei $\delta = 158.5$ und 148.0 ppm und ^1H -Resonanzfrequenzen zwischen 10.5 und 14.5 ppm, wie sie typisch für Imino-Signale von Nukleotiden (BMRB; Biological Magnetic Resonance Data Bank, <http://www.bmrwisc.edu/>) sind.

Die Beobachtung von gut aufgelösten N-C-Korrelationen zwischen Imino- ^{15}N -Resonanzen und ^{13}C -Signalen zwischen $\delta = 170$ und 153 ppm im 2D-NCO-Spektrum (Abbildung 2b) ist konsistent mit $\text{N}^{\text{H}}\text{-C}'$ -Kontakten in Guanin- und Uracil-Nukleotiden und bestätigt damit die Anwesenheit von Nukleinsäuresignalen im Spektrum. Wir beobachteten außerdem einen Satz isolierter Korrelationen im gleichen ^{13}C -Frequenzbereich mit ^{15}N -Resonanzen bei $\delta = 95$ ppm, in guter Übereinstimmung mit typischen chemischen Verschiebungen der N4-Cytosin-Resonanz. Gemäß der für Standardnukleotide spezifischen Peakpositionen und der generellen Dispersion von N-C-Korrelationen spiegeln ^{15}N -Signale in den spektralen Bereichen von $\delta = 80\text{--}100$ und $145\text{--}165$ ppm des ^{15}N -CP-MAS-ZE-Spektrums weitgehend Nukleinsäureresonanzen wider. Die ZEs wurden in der Tat aus einheitlich ^{13}C , ^{15}N -markierten Kulturen nach 4 h Induktion mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) gewonnen, bevor die Zellen in eine stationäre Wachstumsphase eintraten. Unter solchen Bedingungen stellt RNA einen Anteil von ca. 21 Gew.-% der *E. coli*-Makromoleküle, während DNA 10-mal weniger konzentriert ist.^[10] Unter der Annahme einer RNA-Standardhelix in A-Form mit Watson-Crick-Basenpaarung konnten wir einige der beobachteten Korrelationen intra- und intermolekularen Kontakten zwischen protonierten Stickstoffatomen oder anderen Kohlenstoffatomen der RNA-Basen zuordnen (Abbildung 2c). Darüber hinaus fanden wir schwächere Korrelationen zwischen der ^1H -Resonanz von H_2O bei $\delta = 6$ ppm und Uracil-N3/Guanine-N1, die darauf hinweisen, dass ein Teil der Iminogruppen von RNA-Molekülen Wasser ausgesetzt ist.

Wir untersuchten schließlich, ob das überexprimierte integrale Membranprotein PagL in ZEs nachweisbar ist. Dazu

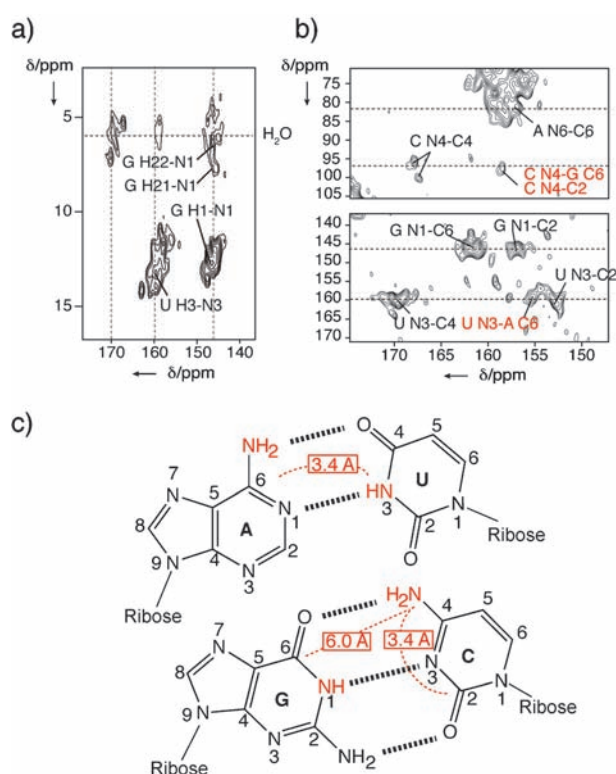


Abbildung 2. Spezielle spektrale Bereiche eines DNP-verstärkten 2D-(^1H , ^{15}N)-FSLG-HETCOR-Spektrums (a) und eines 2D-NCO-Spektrums (b) von ($\text{U-}^{13}\text{C}$, ^{15}N)-markierten ZEs mit Korrelationen, die typisch für Ribonukleinsäuren (RNA) sind. Die Zuordnungen basieren auf BMRB-gemittelten chemischen Verschiebungen der RNAs. c) Chemische Struktur von Standard-RNA-Basen mit Watson-Crick-Basenpaarung. Intra- und intermolekulare Kontakte zwischen Cytosin-N4 oder Uracil-N3 und anderen C-Atomen, die die Zuordnungen untermauern, sind angegeben.

nahmen wir 2D-NCA-Korrelationsspektren auf, in denen Signale von nicht-proteinhaltigen molekularen Komponenten drastisch reduziert sind. Ein DNP-2D-NCA-Spektrum an ZEs (Abbildung S3) zeigte typische Korrelationen gefalteter Proteine mit gut aufgelösten Glycinsignalen (Bereich I) sowie charakteristische N- α -Korrelationen α -helikaler Proteinsegmente (Region II). Wir verglichen unsere Ergebnisse mit ssNMR-Daten bei höherer Temperatur (271 K) an ZH-Proben und an Proteoliposomen (PL), die aufgereinigtes PagL enthielten (Abbildung 3). In Region I (Abbildung 3, obere Reihe), stimmten die Gly-Korrelationen, die sowohl in ZHs (blau) als auch in PL (rot) auftraten, gut mit dem spektralen Muster des DNP-NCA-Experiments an ZEs (schwarz) überein. Solche Korrelationen fehlten in ZH-Spektren von nicht-induzierten Zellen (Abbildung 3, obere Reihe links) was darauf hindeutet, dass die stärksten Signale in diesen Spektren von endogenen Komponenten stammen, die größtenteils frei von Glycinresten sind.

In Region II (Abbildung 3, untere Reihe) waren kaum ssNMR-Korrelations in PL-Proben (rot) sichtbar. In der Tat sollte dieser Bereich hauptsächlich NCA-Korrelationen von α -helikalen oder, zu einem kleineren Teil, von ungeordneten Proteinkonformationen enthalten, was in guter Übereinstimmung mit einer einzigen Thr34-Korrelation des PL-prä-

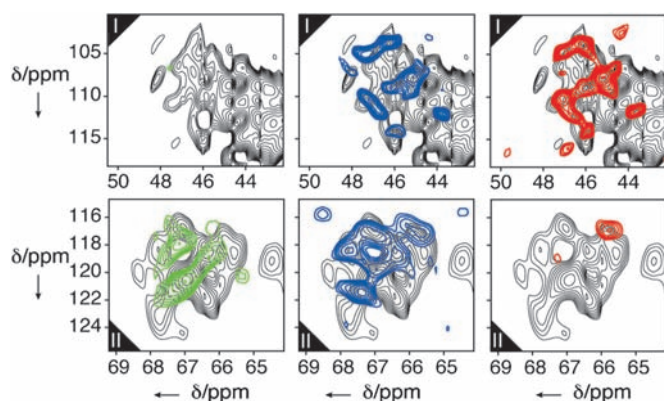


Abbildung 3. Spektraler Vergleich von DNP-verstärkten 2D-NCA-Spektren von ($U\text{-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$)-markierten ZEs (bei 100 K, 8 kHz MAS) (schwarz) und 2D-NCA-Daten von ($U\text{-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$)-markierten ZHs, isoliert von nicht-induzierten (grün) oder PagL-überexprimierenden Zellen (blau), sowie gereinigtes ($U\text{-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$)-PagL in Proteoliposomen (rot) bei 271 K und 13 kHz MAS. Obere Reihe: Region I, untere Reihe: Region II.

parierten β -Fassproteins PagL ist (Abbildung 3). Demgegenüber überlappt das Signalmuster der ZE-Probe mit den beobachteten Korrelationen der ZH-Proben nach Isolierung von nicht-induzierten (grün) und IPTG-induzierten (blau) Zellen. Diese deuten direkt auf das Lipoprotein Lpp hin, welches das am häufigsten vorkommende ZH-assoziierte Protein in exponentiell wachsenden Zelle ist, bei dem Glycin in der Aminosäuresequenz fehlt^[3] und das hauptsächlich α -helikal ist.^[11] Somit deuten die Regionen I und II in Abbildung 3 stark darauf hin, dass sowohl PagL (I) als auch endogenes Lpp (II) in ZE-Proben unter DNP-Bedingungen beobachtet werden kann. Die gemittelten ^{13}C -Linienbreiten von $\delta = 0.8\text{--}0.9$ ppm der Tieftemperaturdaten sind bemerkenswert nahe an den ssNMR-Spektren, die bei 271 K aufgenommen wurden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass DNP erfolgreich mit zellulären Festkörper-NMR-Ansätzen kombiniert werden kann. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass solche Anwendungen nicht nur die spektroskopische Empfindlichkeit um mindestens eine Größenordnung erhöhen können, sondern auch die Detektion von molekularen Komponenten ermöglichen, die nicht spezifischen Membranbereichen zugeordnet sind. Im Vergleich zur Standard-Festkörper-NMR-Spektroskopie können DNP bei niedrigen Temperaturen sowie die Verwendung von freien Radikalen die Probenvorbereitung erschweren und möglicherweise zu reduzierter spektraler Auflösung führen. Nichtsdestoweniger zeigen die hier verwendeten Probenpräparationen eine vergleichbare Auflösung im Vergleich zu Daten bei höherer Temperatur. Zelluläre ssNMR-Spektroskopie, wie sie hier beschrieben ist, ermöglicht damit die Untersuchung ganzer zellulärer Einheiten, ähnlich zur Kryoelektronenmikroskopie. Allerdings werden noch weitere Arbeiten erforderlich sein, um solche Experimente unter In-vivo-Bedingungen durchzuführen.

Erste Untersuchungen in unserem Labor zeigen, dass niedrige Temperaturen und die Verwendung von 15–40 % des Kälteschutzmittels Glycerin Zellstabilität und -viabilität

erhöht. Die in unseren Experimenten gemessenen ^{13}C - und ^{15}N -Signalverstärkungen sind vergleichbar zu früheren Studien, in denen das Radikal TOTAPOL in (protonierten) Purpormembranen^[8] oder bTbK bei Peptiden in deuterierten POPC-Doppelschichten eingesetzt wurden.^[7] Die typischen Abmessungen von *E. coli*-Zellen von $0.5 \times 2 \mu\text{m}$ sind mit den Abmessungen von Amyloid-Nanokristallen vergleichbar, die in früheren erfolgreichen DNP-Experimenten untersucht wurden.^[5] Unsere Studien zeigen, dass sowohl Moleküle der Zellhülle, wie integrale Membranproteine, Lipoproteine, Lipide und periplasmatisches PG, wie auch zytoplasmatische Makromoleküle wie Nukleinsäuren beobachtbar sind. Anders als bei Kristallen wurden Signale von *E. coli*-Partikeln und löslichen Molekülen in vergleichbarem Maße verstärkt. Weitere Verbesserungen sollten durch die Optimierung der Probenpräparation, einschließlich molekularer Deuterierung und der Wahl des Radikals, möglich sein. Die hier vorgestellte DNP-verbesserte ssNMR-Spektroskopie bietet neue Möglichkeiten, um diverse zelluläre Komponenten und deren Rolle in fundamentalen biologischen Prozessen wie Signaltransduktion und Protein(fehl)faltung^[12] auf atomarer Ebene und mit verbesserter Empfindlichkeit zu untersuchen.

Experimentelles

Einheitlich $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -markierte Proben von *E. coli*-Zellen (ZE), Zellhüllen (ZH) und PagL-tragenden Proteoliposomen (PL) wurden mit publizierten Methoden^[3] hergestellt. Pellets von exponentiell wachsenden ZEs wurden durch dreimaliges Waschen in einer $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}/[\text{D}_8]\text{Glycerin}$ -Matrix (10:30:60 Gew.-%) mit 60 mM TOTAPOL^[13] durch Resuspendierungs-/Zentrifugations-Zyklen bei $4000 \times g$ hergestellt. ZHs wurden in einer gleichen Matrix mit 60 mM TOTAPOL bei $95000 \times g$ pelletiert. Danach wurden die ZE- und ZH-Proben mithilfe einer Tischzentrifuge ($14000 \times g$) in 3.2 mm MAS-Rotoren (Bruker Sapphir) mit Silicon-Kopfspacer zentrifugiert. Die Proben wurden vor den DNP-ssNMR-Messungen auf -20°C gekühlt. Die DNP-ssNMR-Messungen wurden auf einem Bruker DNP-Spektrometer durchgeführt, bestehend aus einer 263-GHz-CW-Gyrotronquelle, einer Mikrowellenübertragungsleitung, einem 3.2-mm-Tieftemperatur-MAS-Probenkopf, einer Gas-Kälteversorgung und einem 400-MHz AVANCE-III NMR-System mit wide-bore-Magnet.^[14] Die NMR-Spektren wurden mit Topspin 3.0 (Bruker Biospin, Deutschland) prozessiert und mit Sparky^[15] analysiert. Die ^{13}C - und ^1H -Resonanzen wurden gegen Adamantan^[16] als externe Referenz kalibriert, und die ^{15}N -chemischen Verschiebungen wurden indirekt gegen flüssiges Ammoniumhydroxid referenziert.^[17] Weitere Informationen zur den experimentellen Parametern finden sich in den Hintergrundinformationen.

Eingegangen am 24. August 2011,

veränderte Fassung am 2. November 2011

Online veröffentlicht am 1. Februar 2012

Stichwörter: Dynamische Kernpolarisation · Magic-Angle-Spinning · Membranproteine · NMR-Spektroskopie · Zellen

- [1] a) E. Brunner, C. Groger, K. Lutz, P. Richthammer, K. Spinde, M. Sumper, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *84*, 607–616; b) C. Wasmer, L. Benkemoun, R. Sabate, M. O. Steinmetz, B. Couлары-Salin, L. Wang, R. Riek, S. J. Sauppe, B. H. Meier,

- Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4952–4954; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4858–4860; c) M. Renault, A. Cukkemane, M. Baldus, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 8524–8535; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8346–8357.
- [2] E. R. Andrew, A. Bradbury, R. G. Eades, *Nature* **1958**, *182*, 1659.
- [3] M. Renault, R. Tommassen-van Boxtel, M. P. Bos, J. A. Post, J. Tommassen, M. Baldus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, im Druck.
- [4] a) A. B. Barnes, G. D. Paepe, P. C. van der Wel, K. N. Hu, C. G. Joo, V. S. Bajaj, M. L. Mak-Jurkauskas, J. R. Sirigiri, J. Herzfeld, R. J. Temkin, R. G. Griffin, *Appl. Magn. Reson.* **2008**, *34*, 237–263; b) T. R. Carver, C. P. Slichter, *Phys. Rev.* **1956**, *102*, 975–980; c) A. Lesage, M. Lelli, D. Gajan, M. A. Caporini, V. Vitzthum, P. Mieville, J. Alauzun, A. Roussey, C. Thieuleux, A. Mehdi, G. Bodenhausen, C. Coperet, L. Emsley, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15459–15461; d) T. Maly, G. T. Debelouchina, V. S. Bajaj, K. N. Hu, C. G. Joo, M. L. Mak-Jurkauskas, J. R. Sirigiri, P. C. van der Wel, J. Herzfeld, R. J. Temkin, R. G. Griffin, *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 052211.
- [5] P. C. van der Wel, K. N. Hu, J. Lewandowski, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10840–10846.
- [6] U. Akbey, W. T. Franks, A. Linden, S. Lange, R. G. Griffin, B. J. van Rossum, H. Oschkinat, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 7971–7974; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7803–7806.
- [7] E. Salnikov, M. Rosay, S. Pawsey, O. Ouari, P. Tordo, B. Bechinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5940–5941.
- [8] a) M. L. Mak-Jurkauskas, V. S. Bajaj, M. K. Hornstein, M. Belenky, R. G. Griffin, J. Herzfeld, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 883–888; b) M. Rosay, A. C. Zeri, N. S. Astrof, S. J. Opella, J. Herzfeld, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1010–1011; c) V. S. Bajaj, M. L. Mak-Jurkauskas, M. Belenky, J. Herzfeld, R. G. Griffin, *J. Magn. Reson.* **2010**, *202*, 9–13.
- [9] L. Rutten, J. Geurtsen, W. Lambert, J. J. Smolenaers, A. M. Bonvin, A. de Haan, P. van der Ley, M. R. Egmond, P. Gros, J. Tommassen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 7071–7076.
- [10] F. C. Neidhardt in *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, Vol. 1, 2. Aufl. (Hrsg.: R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. Brooks Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H. E. Umbarger), ASM, Washington, **1996**, S. 13–16.
- [11] W. Shu, J. Liu, H. Ji, M. Lu, *J. Mol. Biol.* **2000**, *299*, 1101–1112.
- [12] M. Renault, M. P. Bos, J. Tommassen, M. Baldus, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4175–4177.
- [13] C. Song, K. N. Hu, C. G. Joo, T. M. Swager, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11385–11390.
- [14] M. Rosay, L. Tometich, S. Pawsey, R. Bader, R. Schauwecker, M. Blank, P. M. Borchard, S. R. Cauffman, K. L. Felch, R. T. Weber, R. J. Temkin, R. G. Griffin, W. E. Maas, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 5850–5860.
- [15] T. D. Goddard, D. G. Kneller, *SPARKY 3*, University of California, San Francisco.
- [16] C. R. Morcombe, K. W. Zilm, *J. Magn. Reson.* **2003**, *162*, 479–486.
- [17] a) J. L. Markley, A. Bax, Y. Arata, C. W. Hilbers, R. Kaptein, B. D. Sykes, P. E. Wright, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1998**, *280*, 933–952; b) R. K. Harris, E. D. Becker, S. M. Cabral de Menezes, R. Goodfellow, P. Granger, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2002**, *22*, 458–483.