

N-H-Spinkopplungen: Einblicke in Proteinwasserstoffbrücken**

Sheng-Qi Xiang, Raghavendran L. Narayanan, Stefan Becker und Markus Zweckstetter*

Wasserstoffbrücken spielen eine große Rolle für die Struktur und Stabilität vieler biochemischer Verbindungen. Die Proteinfaltung, die pathogene Proteinaggregation, die Enzymkatalyse sowie Wechselwirkungen mit Rezeptoren und viele andere Reaktionen hängen von Wasserstoffbrücken ab. Wasserstoffbrücken verändern die isotropen und anisotropen Anteile des chemischen Verschiebungstensors,^[1–5] ebenso die Quadrupolkonstanten der Atomkerne.^[1,6] Dies versetzt die NMR-Spektroskopie in die Lage, Wasserstoffbrücken zu detektieren und zu charakterisieren. Ferner erlaubt die Messung von Spin-Spin-Kopplungskonstanten einen direkten Nachweis von Wasserstoffbrücken,^[9] und theoretische Studien ermöglichen einen Einblick in die Natur von Wasserstoffbrücken.^[10–12]

Wasserstoffbrücken liegen in Proteinen vorwiegend in der Form C=O...H-N vor. Hierbei werden potentiell sechs Spin-Spin-Kopplungskonstanten beeinflusst. Vier davon direkt, da die jeweilige Kopplung über die Wasserstoffbrücke vermittelt wird, und zwei indirekt über die Beteiligung entsprechender Atome. In Proteinen können derzeit jedoch nur die skalare ¹³C-¹⁵N-Kopplung, ³J_{NC}, sowie die skalare ¹H-¹⁵N-Kopplung, ¹J_{NH}, zwischen dem Amid und dem gebundenen Amidproton mittels NMR-Spektroskopie gemessen werden. Die Stärke der ¹J_{NH}-Kopplung hängt von der Elektronenverteilung im Molekül ab.^[11,13,14] Theoretische Studien an kleinen Modellsystemen haben zudem ergeben, dass die ¹J_{NH}-Kopplungskonstante ein negatives Vorzeichen hat und die Stärke der Kopplung sich erhöht, wenn das Amidproton an einer Wasserstoffbrücke beteiligt ist.^[11,14] Ferner kann die Bindung von Liganden zu Konformationsänderungen führen, die sich in Änderungen des ¹J_{NH}-Werts niederschlagen.^[16]

Obwohl ¹J_{NH}-Kopplungskonstanten mit hoher Genauigkeit gemessen werden können, wurden sie bisher nicht für den Nachweis und die Charakterisierung von Wasserstoffbrücken in Biomolekülen verwendet. Dies mag daran liegen, dass die aufgrund einer Wasserstoffbrücke erwartete Änderung in der Stärke der ¹J_{NH}-Kopplungskonstante gering ist.^[11,14] Zudem gab es bisher keine systematische Analyse von ¹J_{NH}-Kopplungskonstanten in ungeordneten Proteinen, welche man als

Referenz verwenden könnte, und über den Einfluss der Temperatur und des pH-Werts auf die ¹J_{NH}-Kopplungskonstante war auch wenig bekannt. Um diese Lücke zu schließen, haben wir eine große Zahl an ¹J_{NH}-Kopplungskonstanten in intrinsisch ungeordneten Proteinen in Abhängigkeit von der Temperatur und dem pH-Wert gemessen und die gemessenen Werte mit ¹J_{NH}-Kopplungskonstanten in gefalteten Proteinen verglichen. Unsere Untersuchungen zeigen, dass sich die Größe der ¹J_{NH}-Kopplungskonstante um bis zu 1.6 Hz bei Bildung einer Wasserstoffbrücke erhöht. Dies ermöglicht die Verwendung von ¹J_{NH}-Kopplungskonstanten für den Nachweis und die Charakterisierung von Wasserstoffbrücken.

¹J_{NH}-Kopplungskonstanten wurden in dem 441 Aminosäuren langen Protein Tau bei einer Magnetfeldstärke von 21.1 T und einer Temperatur von 278 K gemessen (Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen).^[17] Das Tau-Protein gehört zur Klasse der intrinsisch ungeordneten Proteine und nimmt keine rigide Tertiär- oder Sekundärstruktur ein.^[18] Insgesamt konnten wir ¹J_{NH}-Kopplungskonstanten für 367 separierte Signale auswerten. Darin enthalten waren Werte für alle Aminosäuren mit Ausnahme von Prolin und Tryptophan. Letzteres ist nicht in der Tau-Primärsequenz vorhanden. Alle ¹J_{NH}-Kopplungskonstanten desselben Aminosäuretyps wurden zusammengefasst und bildeten die Grundlage für die Berechnung von aminosäurespezifischen Zentralwerten (Abbildung 1 a). Die Berechnung zeigte, dass Glycine und Alanine mit –94.2 Hz und –93.4 Hz die am stärksten negativen Werte haben. Die Werte der anderen Aminosäuren lagen im Bereich von –93.3 Hz (Serin) bis –93.0 Hz (Valin) (Tabelle S2).

Als Nächstes wurde systematisch der Einfluss der Temperatur und des pH-Werts auf die Größe der ¹J_{NH}-Kopplungskonstanten untersucht. Zu diesem Zweck wurden ¹J_{NH}-Kopplungskonstanten in einem weiteren intrinsisch ungeordneten Protein, dem Protein α-Synuklein, bei unterschiedlichen Temperaturen und pH-Werten (pH 5.7: 278 K, 288 K, 298 K; pH 6.0: 278 K; pH 6.5: 278 K; pH 7.4: 278 K, 288 K) gemessen (Tabelle S3). Die Messungen zeigten, dass zunehmender Amidprotonenaustausch bei erhöhtem pH und Temperatur zu einem verringerten Signal-Rausch-Verhältnis in den NMR-Spektren und damit einem erhöhten experimentellen Fehler führen. Nichtsdestotrotz korrelierten die ¹J_{NH}-Kopplungskonstanten bei allen Temperaturen und pH-Werten stark (Abbildungen 1 b,c und S1). Dies belegt, dass ¹J_{NH}-Kopplungskonstanten in α-Synuklein stabil gegenüber pH- und Temperaturveränderungen sind. Ferner zeigte ein Vergleich der ¹J_{NH}-Kopplungskonstanten, welche in dem 130 Aminosäuren langen Tau-Fragment K18 bei 400 und 600 MHz Protonenfrequenz gemessen wurden (Abbildung S2), dass der Beitrag der dynamischen Frequenzänderung^[7,19,20] in intrinsisch ungeordneten Proteinen vernachlässigbar ist. Entsprechend waren die in α-Synuklein bei

[*] Prof. M. Zweckstetter
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie & Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE)
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)
E-Mail: Markus.Zweckstetter@dzne.de
S.-Q. Xiang, R. L. Narayanan, Dr. S. Becker
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)

[**] Wir danken Dr. Jacek Biernat und Prof. Dr. Eckhard Mandelkow für die Herstellung der Tau-Proben.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201209641> zu finden.

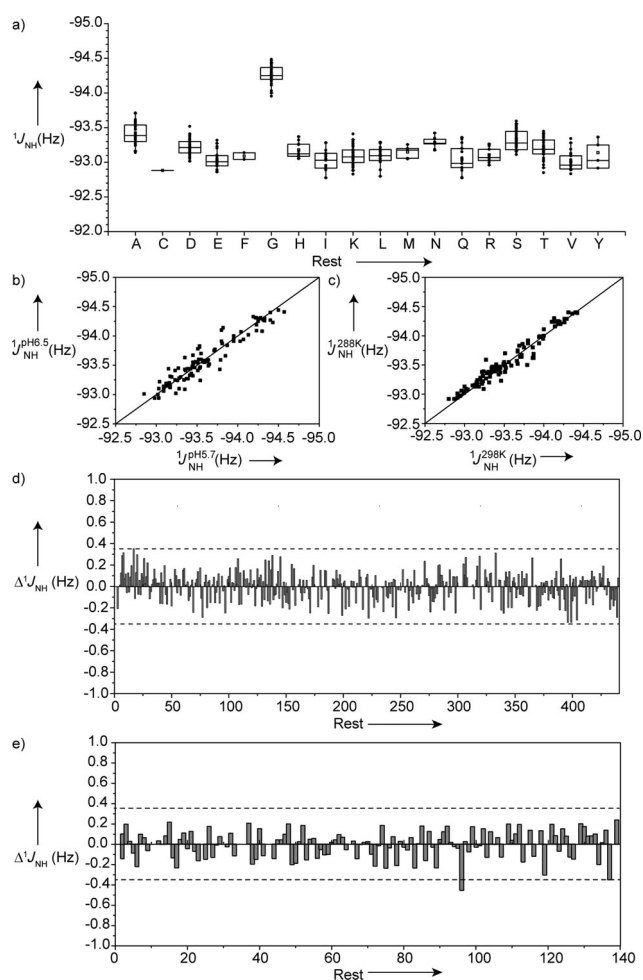


Abbildung 1. a) $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungskonstanten im intrinsisch ungeordneten Protein Tau, die mittels $^1J_{\text{NH}}$ -modulierten heteronuklearen 2D- ^1H , ^{15}N -Einzelquantenkohärenz (HSQC)-Experimenten^[7] gemessen wurden. $^1J_{\text{NH}}$ -Werte wurden entsprechend dem Aminosäuretyp gruppiert und einer Boxplot-Analyse unterzogen. Die Mitte des Kastens markiert den Zentralwert, die Unter- und Oberkante die Grenzwerte von 25 % und 75 %. Mittelwerte sind durch ein leeres Quadrat (\square) gekennzeichnet. b) Korrelation zwischen $^1J_{\text{NH}}$ -Werten in α -Synuklein bei pH 6.5 und pH 5.7, 278 K. c) Korrelation zwischen $^1J_{\text{NH}}$ -Werten in α -Synuklein bei 288 K und 298 K, pH 5.7. Die Messwerte in (b) und (c) wurden mittels eines IPAP-HSQC gewonnen, in welchem langreichweitige Kopplungen nicht unterdrückt werden.^[15] d, e) Abweichungen der $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungskonstanten in Tau (d) und α -Synuklein (e), beide bei pH 6.0, 278 K, von den aminosäurespezifischen Referenzwerten als Funktion der Aminosäure-Nummer. Die gestrichelte Linie markiert 0.35 Hz, die Variation in Δ^1J_{NH} aufgrund von Ungenauigkeiten in den Referenzwerten (a) und möglichen Einflüssen des pH und der Temperatur (b, c).

700 MHz und in Tau bei 900 MHz berechneten Zentralwerte der $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungskonstanten innerhalb der Fehlergrenzen gleich (Abbildung S3).

In den intrinsisch ungeordneten Proteinen α -Synuklein und Tau wurden flüchtige Sekundärstrukturen detektiert.^[17] Die Tau-Reste $^{428}\text{LADEVSA}$ 437 können dabei bis zu 25 % helikale Struktur erreichen. Die Abbildungen 1d und 1e zeigen sekundäre $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungskonstanten, Δ^1J_{NH} , also den Unterschied zwischen den experimentellen Werten und den Zentralwerten aus Tabelle S2. Der Vergleich zeigt, dass

für beide Proteine die Δ^1J_{NH} -Werte kleiner als 0.35 Hz sind, wobei der Wert von 0.35 Hz Ungenauigkeiten in den Referenzwerten (Abbildung 1a) und verbleibende Auswirkungen durch den pH und die Temperatur berücksichtigt (Abbildungen 1b, c und S1). Nur für K96 in α -Synuklein wurden bei unterschiedlichen Temperaturen und pH-Werten höhere Δ^1J_{NH} -Werte gemessen (Tabelle S3). Die Untersuchungen zeigen, dass die Referenzwerte der Tabelle S2 sehr stabil sind. Wasserstoffbrücken, die in den in Tau und α -Synuklein vorhandenen, flüchtigen Sekundärstrukturelementen auftreten könnten, haben keine ausreichende Lebensdauer, um nachweisbare Änderungen der $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungskonstanten hervorzurufen.

Auf Grundlage der aminosäurespezifischen Referenzwerte wurde anschließend die Variation der $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungskonstanten in gefalteten Proteinen untersucht (Abbildung 2). Hierfür eignet sich das Protein Ubiquitin, da es bereits Gegenstand einer Vielzahl genauer NMR-Untersuchungen war.^[5,9,21] Abbildung 2a zeigt Δ^1J_{NH} -Werte als

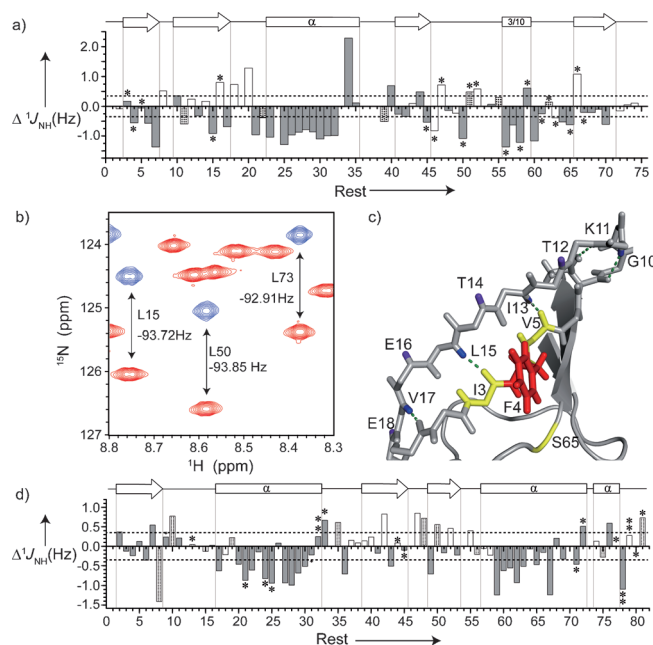


Abbildung 2. $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungskonstanten in globulären Proteinen. a) Abweichungen der $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungskonstanten Ubiquitins von den aminosäurespezifischen Referenzwerten als Funktion der Aminosäure-Nummer. Volle und punktierte Balken markieren Amidprotonen, die an Wasserstoffbrücken des Proteinerückgrats oder zu Seitenketten beteiligt sind. Sterne zeigen eine räumliche Nähe ($< 6 \text{ \AA}$) zu aromatischen Ringsystemen an. Sekundärstrukturen, welche von DSSP^[8] in der Kristallstruktur Ubiquitins (PDB-Kürzel: 1ubq) identifiziert wurden, sind gekennzeichnet. b) Ausschnitt aus einem BSD-IPAP-HSQC-Spektrum Ubiquitins. Die beiden Dublett-Komponenten sind rot und blau gezeigt. c) Vergrößerter Bereich der Kristallstruktur Ubiquitins, der die Wasserstoffbrücken (grün) zwischen den β -Strängen 1 und 2 zeigt. Amidprotonen, die an einer Wasserstoffbrücke beteiligt sind, sind blau, andere lila. Der aromatische Ring von Phe4 ist rot hervorgehoben, und Aminosäuren, die sich in räumlicher Nähe ($< 6 \text{ \AA}$) dazu befinden, sind gelb. d) Abweichungen der $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungskonstanten von D1n1 von den aminosäurespezifischen Referenzwerten als Funktion der Aminosäure-Nummer. Sekundärstrukturen, die von DSSP^[8] in der 3D-Struktur (PDB-Kürzel: 1ghh) identifiziert wurden, sind gekennzeichnet.

Funktion der Aminosäure-Nummer Ubiquitins. Sowohl positive als auch negative Δ^1J_{NH} -Werte im Bereich von -1.3 Hz bis $+2.3$ Hz sind zu sehen. Für Ile23–Asp32 in der α -Helix Ubiquitins wurden ausschließlich negative Δ^1J_{NH} -Werte mit einem Mittelwert von ungefähr -1.0 Hz beobachtet (Abbildung 2a). Positive Δ^1J_{NH} -Werte sind dagegen vorwiegend in unstrukturierten Bereichen und am Rande von Helices und Strängen zu finden.

Entsprechend theoretischer Untersuchungen an kleinen Modellsystemen sollte die $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungskonstante kleiner werden, wenn das Amidproton an einer Wasserstoffbrücke beteiligt ist.^[11,14] Abbildung 2a belegt, dass Amidprotonen mit $\Delta^1J_{\text{NH}} < -0.35$ Hz an Wasserstoffbrücken (bestimmt durch das Programm Whatif)^[22] beteiligt sind. Bei der Auswertung wurden Wasserstoffbrücken sowohl des Proteinerückgrats als auch der Seitenketten berücksichtigt. Ebenso wurden Aminosäuren wie Thr22 als wasserstoffbrückenführend markiert. Für Thr22 wird zwar auf Basis der Kristallstruktur von Ubiquitin (PDB-Kürzel: 1ubq) keine Wasserstoffbrücke erwartet, wenn jedoch das NMR-Konformerensemble (PDB-Kürzel: 1d3z) für eine Whatif-Analyse verwendet wird, hat das Amidproton von Thr22 eine hohe Wahrscheinlichkeit, eine Wasserstoffbrücke mit der eigenen Seitenkette oder der von Asn25 einzugehen. In der Tat wurde bereits in früheren Studien vorgeschlagen, dass das Amidproton von Thr22 an einer Wasserstoffbrücke beteiligt ist, in Übereinstimmung mit einem kleinen Temperaturkoeffizienten.^[23] Ein enger Zusammenhang zwischen der Präsenz einer Wasserstoffbrücke und einem negativen Δ^1J_{NH} -Wert wird ferner durch experimentelle Daten für das Protein DinI (PDB-Kürzel: 1ghh) unterstrichen: Alle Amidprotonen, deren Δ^1J_{NH} -Wert kleiner als -0.35 Hz ist, sind an einer Wasserstoffbrücke beteiligt (Abbildung 2d).

Jedoch gibt es auch Amidprotonen, wie z. B. das von Ala46, dessen Δ^1J_{NH} -Wert kleiner als -0.35 Hz ist und für welches eine Analyse der 3D-Struktur keine Wasserstoffbrücke vorhersagt. Zudem wurde der am stärksten negative Δ^1J_{NH} -Wert für Glu34 gefunden, einen Rest am C-terminalen Ende der α -Helix Ubiquitins, dessen Amidproton an einer Wasserstoffbrücke mit Ile30 beteiligt ist.^[9,21] Im Falle von Glu34 wurde in früheren Studien ein hoher Wert der chemischen Verschiebungsanisotropie des Amidprotons sowie ein kleiner Wert der Deuterium-Quadrupolkopplungskonstante ($\text{N}^2\text{H}\cdots\text{O}=\text{C}$) gemessen. Beides deutet auf eine Destabilisierung der Wasserstoffbrücke hin.^[5,6] Ferner können aromatische Gruppen, die sich in räumlicher Nähe befinden, die $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungskonstante beeinflussen (Abbildung 2c).^[16,24] Es ist jedoch wichtig zu betonen, dass die $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungen im beweglichen C-Terminus Ubiquitins nur minimal von den Referenzwerten abweichen (Abbildung 2a). Dies unterstreicht die Möglichkeit, Wasserstoffbrücken auf der Grundlage von $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungskonstanten zu identifizieren.

Eine quantenmechanische Berechnung der $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungskonstante ist derzeit nicht mit ausreichender Genauigkeit möglich, um einen Vergleich mit experimentellen Werten sinnvoll erscheinen zu lassen.^[12] Unsere Analyse zeigt jedoch, dass $^1J_{\text{NH}}$ -Werte weder mit dem Torsionswinkel ρ ($\text{H}\cdots\text{O}=\text{C}-\text{N}$), welcher α -Helices von β -Faltblättern unterscheidet, noch mit der Länge der Wasserstoffbrücke korreliert (Ab-

bildung S4). Dies belegt, dass die Größe der $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungskonstante nicht einfach eine Aussage über Sekundärstrukturen ermöglicht, sondern eng mit der Präsenz von Wasserstoffbrücken verbunden ist. Ein überzeugender Beleg hierfür findet sich im Δ^1J_{NH} -Muster für die Aminosäuren 14–17 in Ubiquitins β -Strang 2: Positive und negative Δ^1J_{NH} -Werte wechseln sich ab, in Einklang mit der Präsenz und dem Fehlen einer Wasserstoffbrücke in einem β -Strang, der am Rand eines β -Faltblatts liegt (Abbildungen 2a,c). Ein ähnliches, alternierendes Muster der Δ^1J_{NH} -Werte wurde für die am Rande liegenden β -Stränge 2 und 3 von Protein G beobachtet (Abbildung S5). Der Einfluss von Wasserstoffbrücken auf die $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungskonstante wird auch durch einen sehr negativen Δ^1J_{NH} -Wert von Leu50 in Ubiquitin unterstrichen (Abbildung 2a,b). Leu50 befindet sich am Beginn einer kurzen β -Biegung, und sein Amidproton bildet eine Wasserstoffbrücke mit Leu43.

Der Nachweis von Wasserstoffbrücken auf der Grundlage von $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungskonstanten kann skalare ^{13}C - ^{15}N -Kopplungen ergänzen, welche direkt über die Wasserstoffbrücke vermittelt werden. $^3J_{\text{NC}}$ -Kopplungen wurden für fast alle Wasserstoffbrücken in der α -Helix und den β -Strängen Ubiquitins detektiert, nicht aber in der 3_{10} -Helix.^[9,21] Der Grund hierfür liegt in der geänderten Geometrie von Wasserstoffbrücken in 3_{10} -Helices.^[10] In der Tat war es nur möglich, $^3J_{\text{NC}}$ -Kopplungskonstanten in 3_{10} -Helices von konformationell unbeweglichen Peptiden bei sehr hohen Konzentrationen (ca. 10 mM) zu messen.^[25] Demgegenüber beobachteten wir negative Δ^1J_{NH} -Werte für die Aminosäuren 56 bis 58, im Einklang mit der Präsenz der Wasserstoffbrücken in der 3_{10} -Helix Ubiquitins (Abbildung 2a).

Zusammenfassend haben wir gezeigt, dass $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungskonstanten in Proteinen um bis zu 1.6 Hz erhöht werden, wenn das Amidproton an einer Wasserstoffbrücke beteiligt ist. Unsere Daten belegen, dass $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungskonstanten für den Nachweis von flüchtigen Wasserstoffbrücken, wie z. B. von Thr22 in Ubiquitin, welche mittels anderer Methoden nur schwer nachzuweisen sind, von Nutzen sein können. Wir hoffen ferner, dass unsere Studie die Grundlage legt, um den Zusammenhang zwischen Wasserstoffbrücken und $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungskonstanten mittels theoretischer Studien zu untersuchen. Wir schließen mit der Schlussfolgerung, dass die $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungskonstante sich hervorragend für die Untersuchung von Wasserstoffbrücken in Proteinen eignet.

Experimentelles

$^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungskonstanten in hTau40 und α -Synuklein (bei pH 6.0, 278 K) wurden mittels zweidimensionaler $^1J_{\text{NH}}$ -modulierter HSQC-Experimente^[7] an einem Bruker Avance 900 MHz (hTau40) und einem Bruker Avance 700 MHz (α -Synuklein) gemessen. Die Spektren wurden verschachtelt aufgenommen, wobei 15 unterschiedliche Mischzeiten verwendet wurden: 31.9 ms, 31.1 ms, 30.7 ms, 30.3 ms, 29.9 ms, 26.5 ms, 25.5 ms, 25.1 ms, 24.6 ms, 24.3 ms, 21.2 ms, 20.3 ms, 19.8 ms, 19.5 ms und 19.1 ms. Bei jeder Mischzeit wurde ein zweidimensionales HSQC mit $334(^{15}\text{N}) \times 512(^1\text{H})$ (hTau40) und $256(^{15}\text{N}) \times 512(^1\text{H})$ komplexen Punkten (α -Synuklein) aufgenommen. $^1J_{\text{NH}}$ -Werte wurden bestimmt, indem die Signalintensitäten wie beschrieben ausgewertet wurden.^[7]

$^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungskonstanten in hTau40, Ubiquitin und α -Synuklein wurden auch mit einem selektiv entkoppelten Breitband-IPAP-HSQC (BSD-IPAP-HSQC) gemessen,^[26] in welchem langreichweitige Kopplungen wie z.B. $^2J_{\text{NH}\alpha}$, $^3J_{\text{NH}\beta}$ und $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ mittels eines REBURP-Pulses (Bandbreite: $\delta = 2.8$ ppm; zentriert bei $\delta = 2.4$ ppm) refokussiert wurden. Der experimentelle Fehler wurde auf der Basis von Wiederholungsmessungen zu 0.05 Hz bestimmt. $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungskonstanten in K18 wurden mittels eines BSD-IPAP-HSQC-Experiments an Spektrometern Bruker Avance 600 MHz und 400 MHz mit einem Z-Achsen-Gradienten-, Dreifach-Resonanz-, Raumtemperatur-Probenkopf gemessen. Inphase- und Antiphase-Spektren wurden mit $256(^{15}\text{N}) \times 512(^1\text{H})$ komplexen Punkten aufgenommen. $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungskonstanten in Ubiquitin wurden bei 400 MHz, 600 MHz und 900 MHz gemessen, um den Einfluss der dynamischen Frequenzverschiebung (DFS) und dipolarer Restkopplungen berücksichtigen zu können, welche durch die Anisotropie der magnetischen Suszeptibilität des Proteins hervorgerufen werden.^[7] BSD-IPAP-HSQC-Experimente wurden mit $256(^{15}\text{N}) \times 512(^1\text{H})$ komplexen Punkten gemessen. Die Datenverarbeitung erfolgte analog zu Lit. [26]. Vollständige Methoden finden sich in den Hintergrundinformationen.

Eingegangen am 2. Dezember 2012
Online veröffentlicht am 10. Februar 2013

Stichwörter: Amide · Kopplungskonstanten · NMR-Spektroskopie · Proteine · Wasserstoffbrücken

- [1] E. Brunner, U. Sternberg, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1998**, 32, 21–57.
- [2] J. E. Del Bene, S. A. Perera, R. J. Bartlett, *J. Phys. Chem. A* **1999**, 103, 8121–8124.
- [3] P. A. Frey, S. A. Whitt, J. B. Tobin, *Science* **1994**, 264, 1927–1930.
- [4] D. Sitkoff, D. A. Case, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1998**, 32, 165–190.
- [5] N. Tjandra, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8076–8082.
- [6] A. C. LiWang, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1997**, 127, 54–64.
- [7] N. Tjandra, S. Grzesiek, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 6264–6272.
- [8] W. Kabsch, C. Sander, *Biopolymers* **1983**, 22, 2577–2637.
- [9] F. Cordier, S. Grzesiek, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1601–1602.
- [10] M. Barfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 4158–4168.
- [11] M. Pecul, J. Leszczynski, J. Sadlej, *J. Phys. Chem. A* **2000**, 104, 8105–8113.
- [12] T. Tuttle, E. Kraka, A. A. Wu, D. Cremer, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 5093–5107.
- [13] D. Cremer, J. Grafenstein, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, 9, 2791–2816.
- [14] A. B. Sahakyan, A. G. Shahkhatuni, A. A. Shahkhatuni, H. A. Panosyan, *J. Phys. Chem. A* **2008**, 112, 3576–3586.
- [15] M. Ottiger, F. Delaglio, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1998**, 131, 373–378.
- [16] J. H. Ma, J. M. Gruschus, N. Tjandra, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 9884–9885.
- [17] M. D. Mukrasch, S. Bibow, J. Korukottu, S. Jeganathan, J. Biernat, C. Griesinger, E. Mandelkow, M. Zweckstetter, *PLoS Biol.* **2009**, 7, 399–414.
- [18] D. W. Cleveland, S. Y. Hwo, M. W. Kirschner, *J. Mol. Biol.* **1977**, 116, 227–247.
- [19] J. R. Tolman, J. M. Flanagan, M. A. Kennedy, J. H. Prestegard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 9279–9283.
- [20] L. Werbelow, R. E. London, *Concepts Magn. Reson.* **1996**, 8, 325–338.
- [21] G. Cornilescu, J. S. Hu, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 2949–2950.
- [22] G. Vriend, *J. Mol. Graph.* **1990**, 8, 52–56.
- [23] T. Cierpicki, I. Zhukov, R. A. Byrd, J. Otlewski, *J. Magn. Reson.* **2002**, 157, 178–180.
- [24] N. F. Ramsey, E. M. Purcell, *Phys. Rev.* **1952**, 85, 143–144.
- [25] M. Bellanda, M. Rainaldi, Q. B. Broxterman, B. Kaptein, F. Formaggio, M. Crisma, S. Mammi, C. Toniolo, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 3214–3217; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3152–3155.
- [26] L. Yao, J. Ying, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **2009**, 43, 161–170.