

# De-novo-3D-Strukturaufklärung mit Proteinmengen unter einem Milligramm mittels 100-kHz-MAS-Festkörper-NMR-Spektroskopie\*\*

Vipin Agarwal, Susanne Penzel, Kathrin Szekely, Riccardo Cadalbert, Emilie Testori, Andres Oss, Jaan Past, Ago Samoson,\* Matthias Ernst,\* Anja Böckmann\* und Beat H. Meier\*

**Abstract:** Die Festkörper-NMR-Spektroskopie gewinnt zunehmend an Bedeutung, wenn es um Strukturuntersuchungen von kristallinen, sich in Membranen befindlichen, sedimentierten oder fibrillären Proteinen geht. Bei vielen Untersuchungen werden allerdings typischerweise mehrere isotopenmarkierte Proben von 10–20 mg gebraucht. Wir zeigen hier, dass mit einem neuen NMR-Probenkopf, der Rotationsfrequenzen um den magischen Winkel um 100 kHz erreicht, die Linienbreiten der Protonensignale verkleinert werden können. Unter ausschließlicher Verwendung von Strukturinformationen aus so gewonnenen Daten wurde eine gut definierte De-novo-Struktur des Modellproteins Ubiquitin mit zwei Proben zu je etwa 500 µg Protein erhalten. Damit ergeben sich neue Möglichkeiten für die Strukturbestimmung von Proteinen, die nur im Mikrogramm- oder zweistelligen Nanogrammbereich verfügbar sind. Dies sind typische Mengen für zum Beispiel eukaryotische Membranproteine, die in Organismen oder zellfrei exprimiert werden.

Wir beschreiben hier eine Verringerung der Probenmenge für strukturelle Untersuchungen mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie<sup>[1]</sup> um einen Faktor von 40, wenn man von einem Standardaufbau mit einem 3.2-mm-MAS-Rotor ausgeht, der etwa 20 mg Protein fasst. Unter Verwendung des

gleichen Aufbaus würde sich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis („signal-to-noise ratio“, SNR) um den gleichen Faktor verringern. Alternativ könnte die Größe der Spule und des Probenbehälters ebenfalls linear dazu verkleinert werden. In diesem Fall würde sich die Empfindlichkeit um einen Faktor von  $40^{2/3} \approx 10^{[2]}$  reduzieren, was jedoch die Experimente immer noch unzumutbar lang machen würde.

Die Detektion von <sup>1</sup>H anstelle von <sup>13</sup>C stellt ein reizvolles Mittel dar, die Empfindlichkeit der Experimente zu verbessern. Der entsprechende Gewinn durch das viermal höhere gyromagnetische Verhältnis erhöht die Empfindlichkeit fast um das Zehnfache ( $4^{3/2} = 8$ ). Dies ist ausreichend, um die Verringerung der Probenmengen auszugleichen, allerdings nur wenn die Protonenlinie genauso schmal ist wie die Kohlenstofflinie. Das zu erreichen stellt allerdings eine Herausforderung dar, da die starken Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen den Protonen durch die Versuchsausführung ausreichend unterdrückt werden müssen. Ein gedanklich einfacher Ansatz ist es, die MAS-Frequenzen<sup>[3]</sup> zu erhöhen, da im fraglichen Bereich die betrachtete Protonenlinienbreite linear mit steigender Rotationsfrequenz abnimmt. Jedoch konnte mit den bisher technisch möglichen Rotationsfrequenzen keine ausreichende Mittelung erreicht werden, sodass in bisherigen Ansätzen oft MAS mit Verdünnung durch Isotopenmarkierung<sup>[4]</sup> kombiniert wurde, was jedoch zu unerwünschtem Empfindlichkeitsverlust führt. Bei MAS-Frequenzen von 50 kHz und darüber wird Protonendetektion mit Deuterierung und komplettem Rücktausch („Repopulation“, d.h. Amide und austauschbare Seitenketten sind protoniert) realisierbar.<sup>[3b,5]</sup> Rotationsfrequenzen von 60 kHz können mit 1.3-mm-Rotoren erreicht werden, die etwa 2 mg Material fassen können, d.h. viermal so viel wie die 0.8-mm-Rotoren, die für 100-kHz-Rotationsfrequenz benutzt werden. Demnach stellt die Verwendung von 0.8-mm-Rotoren einen Empfindlichkeitsverlust von  $4^{2/3} \approx 2.5$  dar. Betrachtet man allerdings die Reduktion der Protonenlinienbreite um einen Faktor 2 von 50-kHz- auf 100-kHz-MAS, gleicht dieser Gewinn den Verlust fast aus. Daten zur Strukturbestimmung bei 55- und 60-kHz-MAS wurden ergänzt durch Daten von größeren Rotoren oder paramagnetischen Strukturinformationen.<sup>[4c,6]</sup>

Wir zeigen hier, dass bei MAS-Frequenzen von 100 kHz<sup>[7]</sup> die Protonenlinien ausreichend schmal sind, um die nötige Auflösung und Empfindlichkeit für eine De-novo-3D-Strukturbestimmung des Modellproteins Ubiquitin mit Probenmengen von unter einem Milligramm zu erhalten. Mit Proteinproben von weniger als 500 µg wurden fünf Experimente zur sequenziellen Zuordnung der Resonanzen im Proteinrückgrat in ungefähr zwei Tagen aufgenommen. Die <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-

[\*] Dr. V. Agarwal, [+] S. Penzel, [+] K. Szekely, R. Cadalbert, E. Testori, Prof. M. Ernst, Prof. B. H. Meier  
Laboratorium für Physikalische Chemie, ETH Zürich  
8093 Zürich (Schweiz)  
E-Mail: maer@ethz.ch  
beme@ethz.ch

A. Oss, J. Past, Prof. A. Samoson  
NMR Instituut, Tartu Teaduspark, Tehnomeedikum  
Tallinn University of Technology  
Akadeemia tee 15a, 19086, Tallinn (Estland)  
E-Mail: ago.samoson@ttu.ee

Dr. A. Böckmann  
IBCP, UMR 5086 CNRS/Université de Lyon 1  
7 Passage du Vercors, 69367 Lyon (Frankreich)  
E-Mail: a.bockmann@ibcp.fr

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[\*\*] Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds (Fördernummer 200020\_146757), der CNRS und der ETH Zurich der Estonian Science Foundation und ETAG für finanzielle Unterstützung. Außerdem bedanken wir uns für Unterstützung durch die Europäische Kommission (Siebtes Rahmenprogramm (FP7), Vertrag Bio-NMR 261863). MAS = Rotation um den magischen Winkel.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (einschließlich einer SNR-Tabelle, Diederwinkel-/Abstandeinschränkungen, UPLs, Cyana-Statistiken und experimenteller Parameter) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201405730> zu finden.

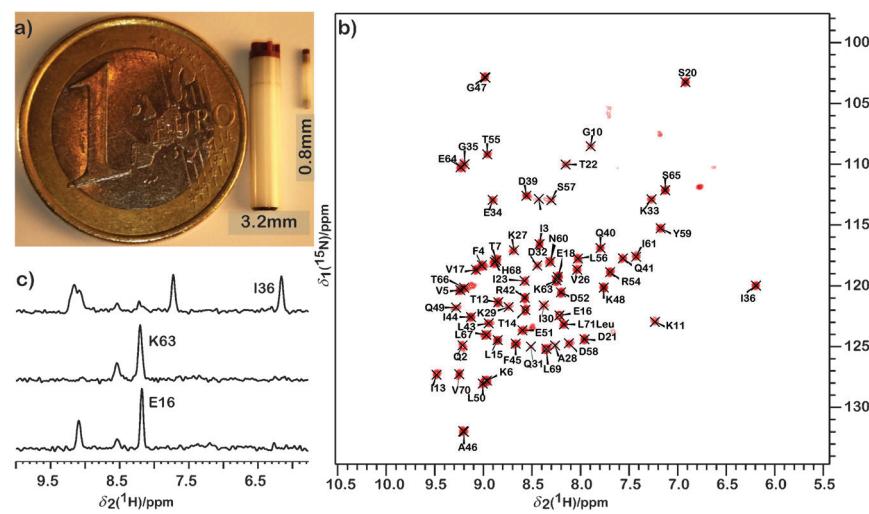
Abstandsinformationen wurden aus 3D- und 4D-Spektren gewonnen, die eine Messzeit von acht Tagen benötigten. Für die Strukturbestimmung sind wir auf eine Kombination von drei Bestandteilen angewiesen:<sup>[8]</sup>

1) TALOS-N<sup>[9]</sup>-Torsionswinkelbeschränkungen, die aus den chemischen Verschiebungen der Rückgratresonanzen erhalten werden, um die Sekundärstruktur zu definieren; 2) H<sup>N</sup>-H<sup>N</sup>-Abstandsbeschränkungen, die insbesondere nützlich sind, um  $\beta$ -Faltblätter zu identifizieren; 3) Abstandsbeschränkungen zwischen Protonen der Methylgruppen, die essenziell sind, um das hydrophobe Innere des Proteins auszuloten und die Proteinfaltung zu bestimmen.

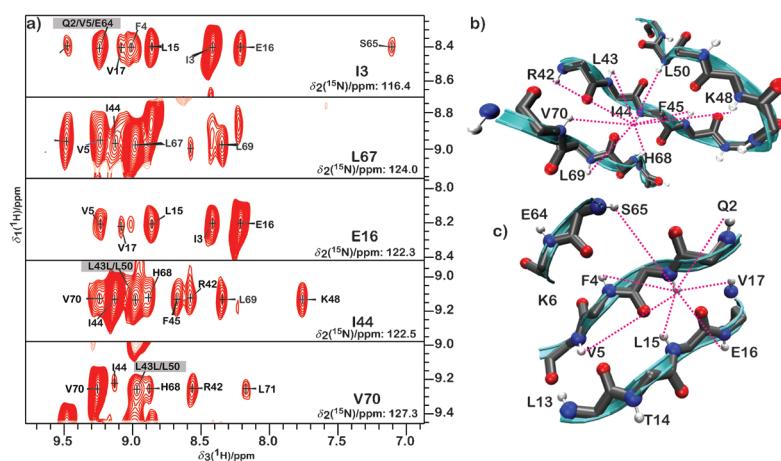
Abbildung 1 a zeigt den Vergleich des 0.8-mm-Rotors, der hier verwendet wurde, mit einem üblichen 3.2-mm-Rotor. Das Probenvolumen im 0.8-mm-Rotor ist etwa 40-mal kleiner und liegt im Bereich von 0.7  $\mu$ L. Wenn man die enthaltene Wassermenge in Betracht zieht, entspricht das weniger als 500  $\mu$ g Protein. In Abbildung 1 b ist das protonendetektierte 2D-<sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HSQC-Spektrum von Ubiquitin dargestellt, das bei 99-kHz-MAS in 9 Minuten aufgenommen wurde. Die Wiederholungsrate wurde durch die  $T_1$ -Zeit der Protonen limitiert und könnte durch paramagnetische Dotierung weiter reduziert werden.<sup>[10]</sup> Die Protonenlinienbreiten im Spektrum liegen im Bereich von 19 bis 73 Hz für die einzelnen Resonanzen, mit einem Mittelwert von 41 Hz. Die Stickstofflinienbreiten dahingegen liegen zwischen 30 und 68 Hz, mit einem Mittelwert von 39 Hz (alle Werte sind ohne Apodisierungsfunktion gemessen, siehe Tabelle S1). Das durchschnittliche SNR der Signale in Abbildung 1 b beträgt  $31 \pm 11$ . Selbst bei MAS-Frequenzen von 100 kHz ist die Protonenlinienbreite noch invers proportional zur Rotationsfrequenz und würde von noch höheren Spinnfrequenzen profitieren.<sup>[11]</sup> Von 60- zu 93-kHz-MAS verlängert sich die gemessene, durchschnittliche  $T_2'$ -Zeit der Protonen von 8.4 ms zu 13.5 ms, was die lineare Abnahme der Linienbreite bestätigt. Für Ubiquitin in Lösung liegen typische Protonenlinienbreiten im Bereich von 6 bis 9 Hz, und Stickstofflinienbreiten variieren konzentrationsabhängig zwischen 3 und 15 Hz.<sup>[12]</sup> Demnach sind die beobachtbaren Linienbreiten im Festkörper unter diesen Bedingungen innerhalb eines Faktors von 3–10 zu denen in Lösung. Für größere Proteine in Lösung werden die Signale im Spektrum breiter, während im Festkörper keine Änderung zu erwarten ist.

Fünf 3D-Experimente wurden gemessen, um die Resonanzen des Rückgrats zuzuordnen: (H)CONH, (H)CANH, (H)CA(CO)NH,<sup>[3b]</sup> bei denen alle Polarisationstransfers auf dipolaren

Kopplungen basieren, ein (H)(CA)CB(CA)NH<sup>[5a]</sup> bestehend aus einer Kombination von Polarisationsübertragungen mittels dipolaren und skalaren Kopplungen, und ein „Hin-und-zurück“-(H)(N)(CA)CB(CA)NH<sup>[12]</sup> mit Polarisationsübertragung durch  $J$ -Kopplungen, außer für die Transferschritte zwischen <sup>1</sup>H und <sup>15</sup>N. Die Messzeit für alle fünf Spektren betrug 58 Stunden. Die Zuordnung der Resonanzen ist zusammen mit den daraus resultierenden TALOS-N<sup>[9]</sup>-Vorhersagen in Tabelle S2 aufgelistet. Insgesamt konnten 13 Signale des methylgruppenmarkierten [<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C]-HSQC-Spektrums aufgrund ihrer eindeutigen Kohlenstoffverschiebung zugeordnet werden. Die anderen Signale wurden mithilfe von Protonensignalen, die aus NMR-Spektren in Lösung unter ähnlichen Bedingungen erhalten wurden, zugeordnet (Details in Tabelle S3).<sup>[13]</sup> Verglichen mit Spektren bei niedrigeren



**Abbildung 1.** a) Vergleich eines 0.8-mm-Rotors mit einem 3.2-mm-Rotor, der als Standard für Strukturuntersuchungen gelten kann. b) <sup>1</sup>H-detektiertes 2D-<sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-Spektrum von 100% reprotoziertem U-(<sup>2</sup>H,<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N)-Ubiquitin (<0.5 mg) bei 99.2 kHz MAS, das in etwa 10 Minuten aufgenommen wurde. c) Drei repräsentative Spuren des 2D-Spektrums veranschaulichen das SNR.



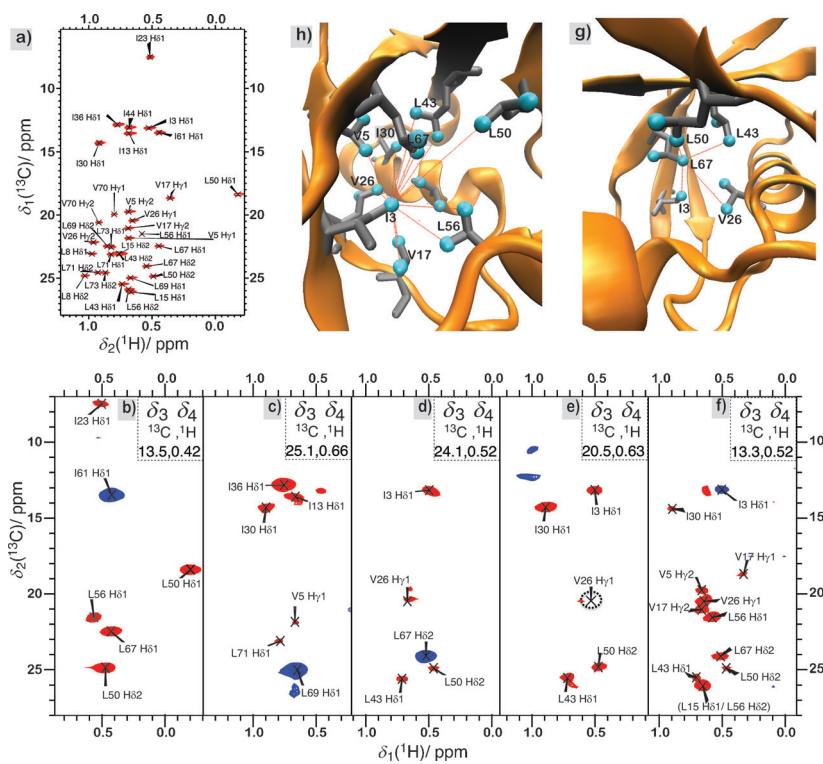
**Abbildung 2.** a) Strukturelle Daten der Amidprotonen aus 3D-Spektren des reprotozierten (<sup>2</sup>H,<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N)-Ubiquitins. (a) Ausschnitte des <sup>1</sup>H-detektierten 3D-<sup>15</sup>N-aufgelösten Experiment mit [<sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H]-Spindiffusion im rotierenden Koordinatensystem. Die nicht eindeutig zuzuordnenden Kreuzsignale sind mit grauen Kästen versehen; alle anderen beschrifteten Kreuzsignale sind eindeutig. b,c) Abbildung der Korrelation von (a) im Ausschnitt der Röntgenkristallstruktur (PDB-Code: 3ONS).

Rotationsfrequenzen zeigen sich keine wesentlichen Verschiebungen der Resonanzfrequenzen. Somit hat eine Rotationsfrequenz von 100 kHz keine Wirkung auf das Protein.

Mit der ( $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-markierten und zu 100% reprotonierten Probe lassen sich Korrelationen zwischen Amidprotonen in 3D- $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -Spektren auflösen, die Abstandsinformationen für die Strukturbestimmung geben. Der  $\text{H}^N$ - $\text{H}^N$ -Polarisationstransfer wurde durch Spindiffusion im rotierenden Koordinatensystem erreicht (siehe die Hintergrundinformationen). Vier repräsentative Ausschnitte des 3D-Spektrums sind in Abbildung 2 a dargestellt. Insgesamt wurden 386 Korrelationssignale automatisch ausgewählt.<sup>[14]</sup> Davon konnten 199 Kreuzsignale eindeutig zugeordnet werden. Die Zuordnung ist in den charakteristischen Ausschnitten des 3D-Spektrums in Abbildung 2 gezeigt. Weiterhin sind die jeweiligen Verbindungen zwischen den Amidprotonen – die sich hauptsächlich in  $\beta$ -Faltblättern befinden – in der Röntgenkristallstruktur (PDB-Code: 3ONS)<sup>[15]</sup> veranschaulicht. Die vollständige Liste der zugeordneten Signale ist in Tabelle S4 gegeben.

Alle 33 ILV-Methylgruppenkorrelationen, die man für Ubiquitin erwartet, sind in dem 2D- $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum (Abbildung 3a) zu sehen. Abbildungen 3 b–f zeigen fünf  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -2D-Ebenen eines 4D-HSQC-DREAM-HSQC-Experiments, welches die HSQC-Spektren des Ursprungs- und Zielspins korreliert und den genauen Polarisationstransferweg aufzeigt.<sup>[8]</sup> Die Kreuzsignale in den dargestellten 2D-Ebenen identifizieren den Ursprung der Polarisation (mittels  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Verschiebung), die dann zu den Methylgruppen übertragen wird, die den Signalen mit blauen Konturlinien entsprechen. In den meisten globulären Proteinen sind die Methylgruppen vorwiegend im hydrophoben Inneren zu finden.<sup>[16]</sup> Kreuzsignale in dem 4D-Spektrum entsprechen fast ausschließlich weitreichenden  $\text{H}^{\text{Met}}$ - $\text{H}^{\text{Met}}$ -Kontakten und stellen entscheidende Abstandsinformationen dar. 82 Kreuzsignale wurden im Spektrum identifiziert. Daraus konnten 73 eindeutig zugeordnet werden, während neun Kreuzsignale zwei Möglichkeiten zur Zuordnung haben. Tabelle S5 listet die erhaltenen Kontakte auf. Als Beispiel sind die Korrelationen zwischen den Protonen L67H $\delta$ 2 und I3H $\delta$ 1 der abgebildeten 2D-Ebenen in der Kristallstruktur gezeigt (Abbildung 3g,h).

Die gewonnenen strukturellen Informationen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Diese Daten reichen aus, um eine gut definierte Struktur mit einem Rückgrat-RMSD von  $(0.6 \pm 0.1)$  Å zu erhalten, wie in Abbildung 4a gezeigt ist. In Abbildung 4b ist die erhaltene Struktur mit der Röntgenkristallstruktur (3ONS) verglichen. Die Details der Strukturberechnung sind in Tabelle S7 aufgelistet. Der RMSD des Rückgrats zwischen der NMR- und Röntgenkristallstruktur



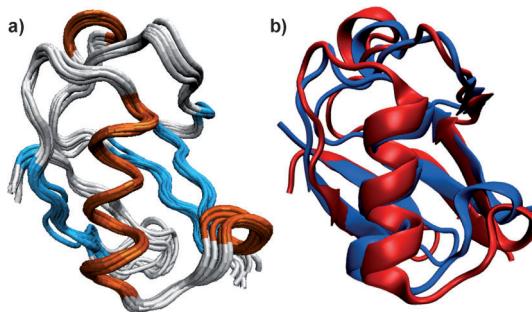
**Abbildung 3:** Spektren von ILV-markiertem Ubiquitin. a) 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum bei 94.5 kHz MAS und einer Proben temperatur von 20°C. b-f) 2D-Ebenen ( $f_1, f_2$ -Dimension) des nicht einheitlich abgetasteten 4D-HSQC-DREAM-HSQC Experiment. Positive Signale (Diagonalsignale) sind in blau dargestellt; negative Signale (Kreuzsignale) in rot. 2D-Ebenen von b) I61 H $\delta$ 1, c) L69 H $\delta$ 1, d) L67 H $\delta$ 2, e) V26 H $\gamma$ 1 und f) I3 H $\delta$ 1. g, h) Bildhafte Darstellung der Korrelationen (rote Linien) in der Röntgenkristallstruktur zwischen Methylgruppen (hellblaue Kugeln) die im 4D-Experiment für L67 $\delta$ 2 und I3 $\delta$ 1 ersichtlich sind.

**Tabelle 1:** Abstandsbeschränkungen, die für die Strukturberechnung benutzt wurden.

Art der Abstände	$\text{H}^N$ - $\text{H}^N$	Met-Met
Komplette Anzahl	130	82
Automatisch <sup>[a]</sup> /Manuell	Automatisch	Manuell
Eindeutige Zuordnung	130	73
Kurze Reichweite ( $ i-j  \leq 1$ )	44	0
Mittlere Reichweite ( $2 \leq  i-j  < 5$ )	50	5
Lange Reichweite ( $ i-j  > 5$ )	36	68
Torsionswinkel (TALOS-N)		120

[a] Die Liste der automatisch ausgewählten Signale findet sich in Tabelle S4.

liegt bei 2.0 Å (verwendet wurden die Aminosäuren 2–71). Dieser Wert wird hauptsächlich durch relative Verschiebungen der jedoch klar definierten Helices und Faltblätter hervorgerufen sowie durch Unterschiede in der halbflexiblen Schlaufe. Um die Stabilität der Strukturberechnung zu bestätigen, wurden die Obergrenzen der Methylgruppenkontakte und die der Amidkontakte unabhängig voneinander auf einem Raster von 4.5–7 Å und 5–7 Å variiert. Jede Berechnung wurde außerdem für verschiedene Ausgangsbedingungen wiederholt. Der RMSD-Wert für das gesamte Strukturbündel ist  $(0.7 \pm 0.2)$  Å. Trotz der geringeren Probenmenge ist die Anzahl der langweitreichenden  $\text{H}^N$ - $\text{H}^N$ -( $\text{H}^{\text{Met}}$ - $\text{H}^{\text{Met}}$ )-Abstandsbeschränkungen bei 100-kHz-MAS um etwa 3-



**Abbildung 4.** a) Strukturbündel der zehn energetisch günstigsten Strukturen (aus insgesamt 200 berechneten Strukturen), bestimmt durch NMR-Spektroskopie. Sekundärstrukturen sind hellblau ( $\beta$ -Faltblätter), orange ( $\alpha$ -Helices) und grau (Schlaufen) kenntlich gemacht. b) Struktur von Ubiquitin, bestimmt mit Festkörper-NMR-Spektroskopie (rot) und überlagert mit der Röntgenkristallstruktur (blau, PDB-Code: 3ONS).

(1.5)-mal größer als vorhergehende Daten bei 60-kHz-MAS mit deutlich größerer Probemenge.<sup>[4c]</sup>

Wir haben gezeigt, dass eine De-novo-Strukturbestimmung mit weniger als 500  $\mu$ g (59 Nanomol) Protein mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie durchführbar ist. Der Vergleich der transversalen Relaxationszeiten der Protonen bestätigt die erwartete Verbesserung der homogenen Linienbreite mit höheren Rotationsfrequenzen und der daraus folgenden Auflösungs- und Empfindlichkeitsverbesserung: Die gesamte Messzeit für alle Spektren betrug 11 Tage (2.4 Tage für die sequenzielle Zuordnung, 8.5 Tage für Spektren mit Strukturdaten). Wenn man die Qualität der Spektren anhand der Linienbreite definiert, sollte diese unabhängig von der Proteingröße sein. Dies lässt genügend Spielraum, sich größeren Proteinen, Proteinkomplexen, oder Proteinen, die in Lipiden verdünnt sind, zuzuwenden. Allerdings können dynamische Aspekte des jeweiligen Proteins diesbezüglich eine Rolle spielen. Wir glauben, dass in Zukunft technische Fortschritte weitere Verbesserungen der Linienbreite und SNR bringen werden. Das hier vorgestellte Verfahren erweitert das Anwendungsgebiet der Festkörper-NMR-Spektroskopie auf Proteine, die schwer in mehreren Milligramm exprimiert werden können, wie eukaryotische Membranproteine, wo Mengen oft nicht wenige Milligramm pro Liter (im Organismus) oder Milliliter (zellfrei) überschreiten.

Eingegangen am 30. Mai 2014  
Online veröffentlicht am 15. September 2014

**Stichwörter:** Festkörper-NMR-Spektroskopie · Proteinstruktur · Protonendetektion · Rotation um den magischen Winkel

- [1] a) F. Castellani, B. Van Rossum, A. Diehl, M. Schubert, K. Rehbein, H. Oschkinat, *Nature* **2002**, *420*, 98; b) A. Loquet, B. Bardiaux, C. Gardiennet, C. Blanchet, M. Baldus, M. Nilges, T. Malliavin, A. Böckmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3579; c) T. Manolikas, T. Herrmann, B. H. Meier, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3959; d) C. Gardiennet, A. K. Schutz, A. Hunkeler, B. Kunert, L. Terradot, A. Bockmann, B. H. Meier, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 7977; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7855; e) I.

Bertini, C. Luchinat, G. Parigi, E. Ravera, B. Reif, P. Turano, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 10396; f) C. Wasmer, A. Lange, H. Van Melckebeke, A. B. Siemer, R. Riek, B. H. Meier, *Science* **2008**, *319*, 1523; g) H. Van Melckebeke, C. Wasmer, A. Lange, E. Ab, A. Loquet, A. Böckmann, B. H. Meier, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13765; h) S. Jehle, P. Rajagopal, B. Bardiaux, S. Markovic, R. Kuhne, J. R. Stout, V. A. Higman, R. E. Klevit, B. J. van Rossum, H. Oschkinat, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 1037; i) L. Shi, I. Kawamura, K.-H. Jung, L. S. Brown, V. Ladizhansky, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1338; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1302.

- [2] A. Samoson, T. Tuherm, J. Past, A. Reinhold, I. Heinmaa, T. Anupold, M. E. Smith, K. J. Pike, *eMagRes*, Wiley, Hoboken, **2010**.
- [3] a) J. R. Lewandowski, J.-N. Dumez, U. Akbey, S. Lange, L. Emsley, H. Oschkinat, *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 2205; b) M. J. Knight, A. L. Webber, A. J. Pell, P. Guerry, E. Barbet-Massin, I. Bertini, I. C. Felli, L. Gonnelli, R. Pierattelli, L. Emsley, A. Lesage, T. Herrmann, G. Pintacuda, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 11901; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11697; c) D. Zhou, A. Nieuwkoop, D. Berthold, G. Comellas, L. Sperling, M. Tang, G. Shah, E. Brea, L. Lemkau, C. Rienstra, *J. Biomol. NMR* **2012**, *54*, 291.
- [4] a) V. Agarwal, A. Diehl, N. Skrynnikov, B. Reif, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12620; b) V. Chevelkov, K. Rehbein, A. Diehl, B. Reif, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3963; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3878; c) M. Huber, S. Hiller, P. Schanda, M. Ernst, A. Böckmann, R. Verel, B. H. Meier, *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 915; d) S. Asami, K. Szekely, P. Schanda, B. H. Meier, *J. Biomol. NMR* **2012**, *54*, 155.
- [5] a) E. Barbet-Massin, A. Pell, K. Jaudzems, W. T. Franks, J. Retel, S. Kotelovica, I. Akopjana, K. Tars, L. Emsley, H. Oschkinat, A. Lesage, G. Pintacuda, *J. Biomol. NMR* **2013**, *56*, 379; b) A. Marchetti, S. Jehle, M. Felletti, M. J. Knight, Y. Wang, Z.-Q. Xu, A. Y. Park, G. Otting, A. Lesage, L. Emsley, N. E. Dixon, G. Pintacuda, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10914; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10756.
- [6] M. J. Knight, A. J. Pell, I. Bertini, I. C. Felli, L. Gonnelli, R. Pierattelli, T. Herrmann, L. Emsley, G. Pintacuda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 11095.
- [7] a) V. Agarwal, T. Tuherm, A. Reinhold, J. Past, A. Samoson, M. Ernst, B. H. Meier, *Chem. Phys. Lett.* **2013**, *583*, 1; b) Y. Q. Ye, M. Malon, C. Martineau, F. Taulelle, Y. Nishiyama, *J. Magn. Reson.* **2014**, *239C*, 75.
- [8] M. Huber, A. Böckmann, S. Hiller, B. H. Meier, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 5239.
- [9] Y. Shen, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **2013**, *56*, 227.
- [10] N. P. Wickramasinghe, M. Kotecha, A. Samoson, J. Past, Y. Ishii, *J. Magn. Reson.* **2007**, *184*, 350.
- [11] B. H. Meier, A. Samoson, A. Böckmann, M. Ernst, V. Agarwal, M. Huber, S. Penzel, F. Ravotti in *54th Experimental Nuclear Magnetic Resonance conference (ENC)* (Hrsg.: M. Garwood), Asilomar, CA, **2013**.
- [12] J. Cavanagh, W. J. Fairbrother, A. G. Palmer, M. Rance, N. J. Skelton, *Protein NMR Spectroscopy*, Elsevier Academic Press, Amsterdam, **2007**.
- [13] a) 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; b) A. J. Wand, J. L. Urbauer, R. P. McEvoy, R. J. Bieber, *Biochemistry* **1996**, *35*, 6116.
- [14] T. J. Stevens, R. H. Fogh, W. Boucher, V. A. Higman, F. Eisenmenger, B. Bardiaux, B. J. Van Rossum, H. Oschkinat, E. D. Laue, *J. Biomol. NMR* **2011**, *51*, 437.
- [15] K. Y. Huang, G. A. Amodeo, L. Tong, A. McDermott, *Protein Sci.* **2011**, *20*, 630.
- [16] a) V. Tugarinov, L. E. Kay, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1567; b) A. M. Ruschak, L. E. Kay, *J. Biomol. NMR* **2010**, *46*, 75.