

핵자기공명분광법을 이용한 생체고분자물질의 구조 연구

안희철

1. 서론

핵자기공명분광법(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)은 X선 결정법(X-ray crystallography)과 더불어 단백질, 핵산 등을 비롯한 생체고분자물질의 3차원 구조를 원자수준에서 규명할 수 있는 방법이다. 특히, 핵자기공명법은 용액상태에서 생체고분자물질의 3차원 구조를 연구하는 유일한 방법으로, 3차원 구조 이외에도 고분자물질의 운동성, 반응 동력학, 분자인지 등의 연구가 가능하다.

1945년, 원자핵의 에너지 준위가 주어진 외부자장에 의해 구별된다는 기본원리의 발견 이래, 1960년대의 푸리에 변환 방법의 개발 및 다차원 핵자기공명분광법의 개발 등을 바탕으로 비약적인 발전을 거듭한 결과 핵자기공명분광법은 분자의 구조를 규명하는데 있어 가장 기본적인 분석방법으로 자리 잡았다. 또한 핵자기공명분광기의 분해능과 감도의 증가와, 단백질 및 핵산의 동위요소 표지법의 개발 등을 비롯한 분자생물학적 연구방법의 발전으로 인하여 현재 약 30 kDa까지의 분자량을 가지는 생체고분자물질의 3차 구조 규명이 어렵지 않게 이루어지고 있으며 향후 훨씬 더 큰 분자량의 생체분자물질에 까지 적용 가능할 것으로 생각된다.

본 지상강좌에서는 주로 단백질을 중심으로 생체고분자물질의 핵자기공명연구 방법에 있어 기본 원리, 1차원 및 다차원 핵자기공명 측정방법, 생체고분자시료의 제조 방법, 3차 구조계산 및 응용에 대해 간략하게 다루고자 한다.

2. 본문

2.1 NMR의 기본원리

스핀 각모멘트를 가진 원자핵은 주어진 축에 대해 회전하는 성질(스핀)을 가지며 마치 폐쇄회로에서의 전류와 같이 자기장을 형성한다. 회전하는 원자핵에 의해 생성되는 자기장의 세기는 핵자기모멘트(m)에 의해 설명되는데, 핵자기모멘트는 스핀각모멘트에 비례한다.

그림 1에서와 같이 핵자기모멘트를 가지는 원자핵이 외부 자기장 B하에 존재하게 되면 회전하는 원자핵의 성질에 의해 주어진 자기장을 축으로 하여 세차운동한다(Larmor precession). 이 세차운동의 주파수는 원자핵의 스핀에 의존하며 외부자기장의 세기에 비례한다.

특정 핵의 자화(magnetization)를 측정하기 위하여 외부자기장과 수직인 방향으로 라디오파수를 가진 자기장을 가한다. 만약 이 펄스가 특정 핵의 Larmor 주파수와 일치하게 되면 핵의 자화벡터는 외부자기장과 수직인 평면에서 회전하게 되며(자기공명현상), 이때의 회전 각속도 역시 Larmor 주파수와 일치하게 된다. 회전하는 자기장은 유도전류를 형성하므로 receiver coil을 통하여 측정 가능하다.

외부자기장에 수직인 핵의 자화는 시간에 따라 감소하여 평형 상태로 돌아가게 되며 이때 시간에 따라 변화하는 신호의 세기와 위상(free induction decay, FID)을 측정한다(**그림 2**).

핵자기공명현상의 직접적인 측정 결과인 FID는 시간에 대한 함수로 이를 주파수에 대한 함수인 NMR 스펙트럼으로 변환하기 위하여 푸리에 변환이 도입되었다. 푸리에 변환의 결과 각각의 핵의 화학적 환경을 나타내는 주파수 값(chemical shift)을 가지는 NMR 스펙트럼을 얻을 수 있다(**그림 3**).

2.2 1차원 NMR 분광법

각각의 1차원 NMR 실험은 preparation과 detection의 두 가지 요소로 이루어져 있다. Preparation 동안 각각의 스핀시스템은 특정한 상태로 존재하게 되며 detection 시간동안 신호로 저장된다.



안희철

1995 서울대학교 제약학과(학사)
 1997 서울대학교 약학과(석사)
 2002 서울대학교 약학과(박사)
 2003~2006 University of Wisconsin-Madison (Research Associate)
 2006~현재 한국과학기술연구원, 특성분석센터 선임연구원

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for the Structural Study of Biomacromolecules

한국과학기술연구원 특성분석센터 (Hee-Chul Ahn, Advanced Analysis Center, Korea Institute of Science and Technology (KIST), 39-1 Hawolgogdong, Sungbuggu, Seoul 136-791, Korea) e-mail: hcahn@kist.re.kr

그림 4에서는 가장 간단한 1차원 NMR 측정방법을 보여준다.

외부자기장(z축)에 놓여 있는 수소원자핵들의 자화(Mz)는 x축 방향에서 가해진 90° 펄스에 의해 y축 방향(My)에 놓이게 된다. 펄스를 가한 후 각각의 스핀은 고유의 Larmor의 주파수를 가지면서

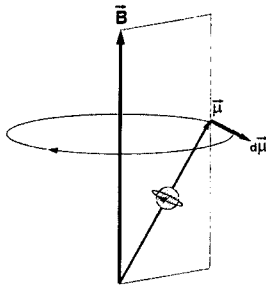


그림 1. 외부자기장에서 스핀각모멘트를 가진 원자핵의 세차운동(Larmor precession).

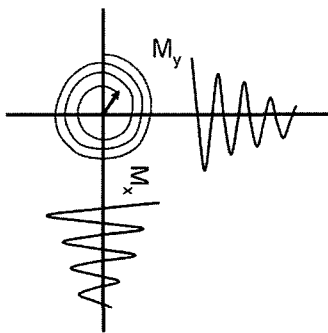


그림 2. 외부자기장에 수직방향인 평면에서 측정된 시간에 따른 신호의 크기와 위상(FID).

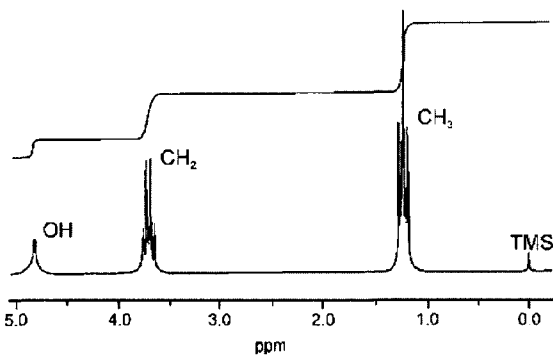


그림 3. 에탄올의 1H-NMR 스펙트럼. 각각 수소들의 화학적 환경으로 인해 고유의 공명주파수(chemical shift)를 가짐.

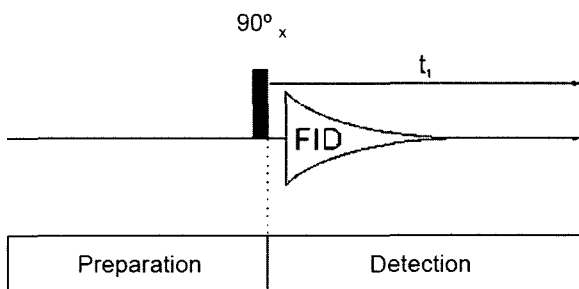


그림 4. 90° 펄스를 이용한 간단한 1차원 NMR 측정방법.

z축 주위를 돌게 되며 이때 유도된 신호가 receiver에 기록된다. 신호는 T₂ 완화(스핀-스핀 완화)에 의해 시간에 따라 강도가 감소하게 된다. signal to noise 비율(S/N ratio)을 높이기 위해 여러 차례 반복해서 신호를 합하는 과정이 필요하며 그 후 푸리에 변환을 통해 1차원 NMR 스펙트럼을 얻는다.

그림 3은 에탄올의 1H NMR 스펙트럼이다. 스펙트럼은 3개의 신호를 보여주고 있으며 그 중 두개의 신호는 몇 개의 신호로 다시 나뉘어 있다. 이 3개의 신호가 각각 -OH, -CH₂, 그리고 -CH₃에 존재하는 수소원자에 해당한다. 메틸기에 존재하는 3개의 수소원자는 모두 같은 화학적인 환경에 놓여있기 때문에 같은 위치에서 공명을 일으키며 2개의 메틸렌 수소 역시 같은 환경에 존재하므로 하나의 chemical shift 값을 갖는다. 그림 3의 위쪽에 나타난 선은 신호들의 강도를 표시하는 것으로 각각의 위치에 해당하는 수소원자의 수에 비례하여 나타난다. 즉 OH, CH₂, CH₃에서 유래하는 신호의 강도의 비율이 1 : 2 : 3으로 나타난다.

2.3 Chemical Shift

원자핵을 둘러싸고 있는 전자들은 아주 작은 자기장을 형성하므로 외부자기장으로부터 원자핵을 차폐시키는 역할을 한다. 따라서 같은 분자내의 수소 핵들이라 하더라도 각각의 핵들은 조금씩 다른 화학적인 환경에 놓여있게 되므로 전자로 인한 차폐되는 정도가 달라 Larmor 주파수 역시 달라진다. 이러한 효과를 chemical shift 라 하며 NMR에서 가장 중요한 파라미터의 하나이다. Chemical shift의 값은 보통 ppm의 단위를 가지며 아래와 같은 식으로 표시한다.

$$\text{Chemical shift (ppm)} = \frac{(W_{\text{signal}} - W_{\text{reference}})}{W_{\text{reference}}} \times 10^6$$

기준 주파수는 주로 tetramethylsilan(TMS)의 메틸 수소의 값을 사용하며 단백질 NMR에서는 DSS(2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonic acid)의 값을 사용하기도 한다.

Chemical shift의 단위로 Hz 대신 ppm의 단위를 사용함으로써 외부자기장의 세기와 상관없이 서로 다른 세기의 자기장하에서 동일한 chemical shift 값을 얻을 수 있다.

다른 화학적 그룹은 서로 다른 chemical shift를 가지기 때문에 chemical shift는 NMR 스펙트럼으로부터 얻을 수 있는 가장 중요한 정보이다. 단백질의 경우를 예로 들면 HN, H α , aromatic 그리고 aliphatic 수소들은 각각 특징적인 chemical shift를 가진다. 또한 chemical shift 값들은 단백질의 2차 구조에 대한 정보를 제공하기도 한다.

2.4 Scalar Coupling

그림 3에서 에탄올 CH₂와 CH₃ 수소들의 신호는 다중선으로 분리(splitting)되어 있다. 이 splitting은 수소들 사이의 화학결합에 기인한 scalar coupling에 의해 발생한다. Scalar coupling은 nuclear overhauser effect와 더불어 핵들 간의 자화의 이동을 가능하게 하는 NMR 분광학에서 가장 중요한 메커니즘이다.

그림 3에서 보이는 바와 같은 다중선에서 splitting의 정도(Hz)는 자기장의 세기와 관계없는 coupling constant J를 나타낸다. 일반적으로 하나(¹J), 둘(²J, geminal coupling), 그리고 셋(³J, vicinal coupling) 화학결합까지 coupling이 관측된다. Vicinal coupling은

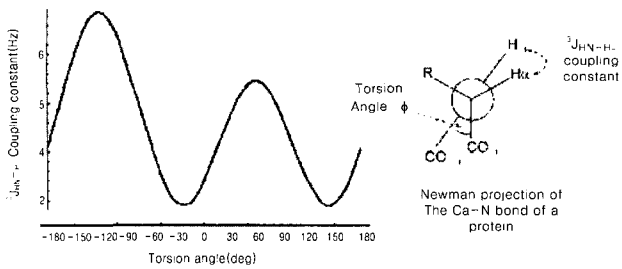


그림 5. $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ coupling constant와 torsion angle과의 관계.

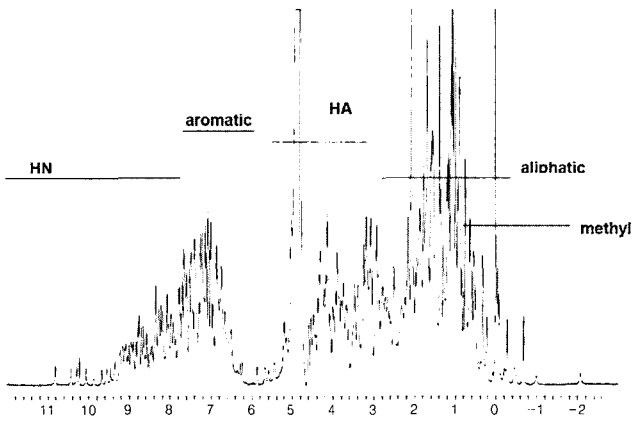


그림 6. Hen egg white lysozyme의 ^1H NMR 스펙트럼.

결합에 관여한 수소들의 각도와 관련이 있으며 Karplus식에 의해 아래와 같이 표현된다.

$$J(\rho) = A \times \cos^2(\phi - 60) - B \times \cos(\phi - 60) + C$$

또한 Karplus 식에 의해 coupling constant와 단백질의 torsion angle 사이에는 그림 5와 같은 관계가 성립된다.

2.5 2차원 및 다차원 NMR 분광법

그림 6은 hen egg white lysozyme의 1차원 ^1H NMR 스펙트럼이다. 그림에서 보는 바와 같이 단백질의 1차원 NMR 스펙트럼은 거의 모든 신호선들이 중첩되어 있어 해석하기에 너무 복잡한 양상을 지닌다. 새로운 축을 도입하여 스펙트럼을 2차원으로 전개함으로써 복잡한 스펙트럼을 비교적 간단하게 할 수 있으며 경우에 따라 필요한 정보만을 얻을 수도 있다.

2차원 실험은 1차원 실험의 preparation과 detection 외에 indirect evolution(T_1)과 mixing sequence를 추가함으로써 완성된다(그림 7(A)). 얻어진 결과는 T_1 과 T_2 시간에 관련된 FID로 나타나며 2차원 푸리에 변환 결과 2개의 주파수 축을 가지는 평면 스펙트럼을 얻을 수 있다. 그림 7(A)는 같은 종류 핵종(주로 수소)들 사이의 2차원 NMR 실험 방법의 예시이다. 서로 다른 핵종들, 예를 들면, 수소와 질소(^{15}N) 및 수소와 탄소(^{13}C) 사이에서도 2차원 NMR 실험은 가능하다(그림 7(B)). 이러한 실험을 통하여 ^1H - ^{15}N 또는 ^1H - ^{13}C 결합을 통한 원자들의 정보를 얻을 수 있다.

마찬가지 방법으로 3차원 NMR 실험은 2차원 실험의 mixing 시간과 direct data acquisition 사이에 또 하나의 indirect evolution 시간과 mixing 시간을 추가함으로써 완성된다(그림 7(C)).

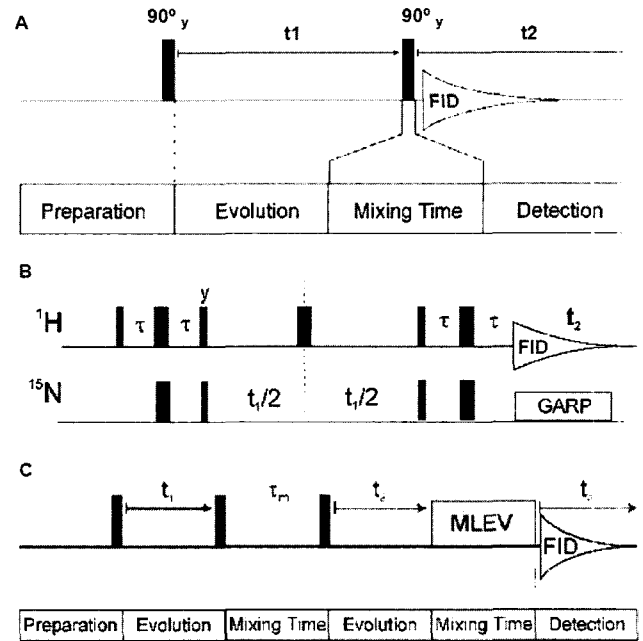


그림 7. 2차원 동종핵간 (A), 이종핵간 (B) 및 3차원 (C) NMR 측정방법.

2.6 단백질 NMR 분광법

단백질, 핵산으로 대표되는 생체고분자물질은 각각 아미노산과 nucleotide라는 단위체가 중첩되어 이루어진다. 단백질을 구성하는 원자들은 주로 수소, 질소, 탄소, 산소, 및 소량의 황으로 이루어져 있으며 분자량은 수 kDa부터 수백 kDa 이상이 되는 경우도 있다. 따라서 그림 6에서 보는 것처럼 1차원 NMR 스펙트럼은 신호의 중첩과 상대적으로 큰 신호선폭(signal line broadening)으로 인해 해석하기 힘들다. 따라서 2차원, 3차원 NMR 방법과 같은 다차원 측정법이 필수적이다.

질소와 탄소 역시 단백질을 구성하는 매우 중요한 원소이며 이들 원소로부터 구조해석에 필요한 정보를 얻는 것은 NMR을 이용한 단백질의 구조연구에 매우 중요하다. 이를 위하여 인위적으로 단백질 내의 탄소와 질소를 각각 ^{13}C 및 ^{15}N 동위원소로 치환하는 과정이 필요하다. 현재 NMR 측정에 사용되는 대부분의 단백질 시료는 대장균과 같은 세균에서 유전자 재조합방법을 이용하여 대량 생산 방법을 이용하기 때문에 탄소 및 질소 공급원이 제거된 최소배지에 $^{13}\text{C}_6$ -glucose 및 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 과 같은 동위원소 표지물질을 유일한 탄소 및 질소원으로 공급함으로써 동위원소 표지된 단백질을 생산할 수 있다.

생산된 동위원소 표지 단백질은 고순도로 정제후 농축(0.2~1 mM, 500 ul)하여 NMR tube에 옮겨진 후 일련의 동종 및 이핵종 간 2차원, 3차원 실험을 통하여 단백질 스펙트럼을 분석한다(그림 8). 3차원 구조계산을 위한 스펙트럼 분석은 단백질로부터 유래한 각각의 수소, 질소, 탄소 공명선들을 확인하는 작업이 필수적이다. 가능한 모든 공명선들을 동정하여야 비로소 3차원 구조계산에 필요한 거리정보(distance restraints)를 충분히 얻을 수 있다. 3차원 구조계산에 필요한 거리정보는 거의 대부분 단백질의 수소-수소 간 NOE (nuclear overhauser effect)에 의존하는데 NOE는 두 수소 간 거리의 여섯제곱에 반비례한다. 또 하나의 중요한 구조계산 정보는 torsion angle이다. 그림 5에서와 같이 얻어진 torsion angle

값 역시 수치화하여 거리정보와 함께 컴퓨터를 이용한 구조계산의 직접적인 입력 자료로 활용된다.

2.7 NMR 스펙트럼의 분석

NMR 스펙트럼 분석의 주된 목표는 가능한 모든 수소원자들 사이의 거리와 torsion angle의 정보를 얻어내는 것이다. 이를 위한 가장 근본적인 토대는 각각의 공명선을 단백질의 개개 원자핵과 일치시키는 작업이다(resonance assignment). 비교적 작은 크기의 단백질 또는 화합물의 경우 2D-COSY(correlation spectroscopy), 2D-TOCSY(total correlation spectroscopy), 및 2D-NOESY(nuclear overhauser enhancement spectroscopy)를 사용하여 단백질의 구성요소인 아미노산의 스핀시스템을 결정하고 전후에 존재하는 아미노산을 순서적으로 연결할 수 있다(그림 9).

2차원 스펙트럼을 이용한 단백질의 resonance assignment는 약 10 kDa까지의 단백질에 적용가능하다. 반면 단백질의 크기가

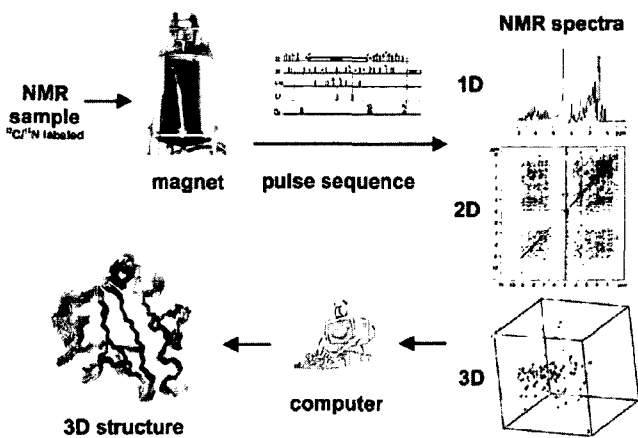


그림 8. 단백질 NMR 분광법의 실험 개념 모식도.

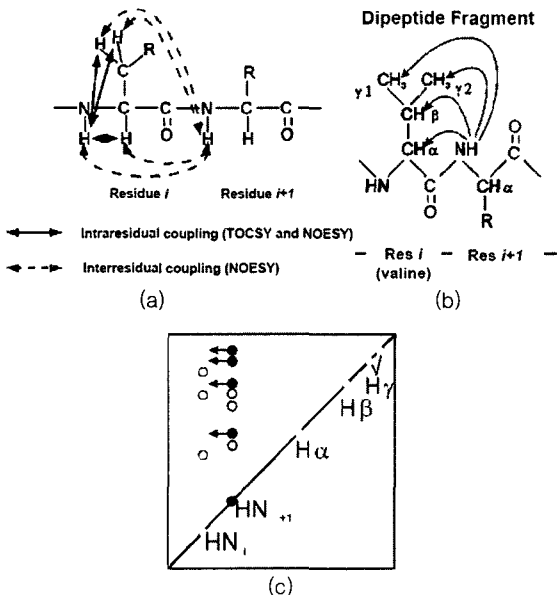


그림 9. TOCSY와 NOESY 스펙트럼에서 원자핵 간 연결 모식도 (a), 두개의 연속된 아미노산에서 뒤에 있는 아미노산의 HN과 앞 아미노산의 수소와의 NOE 연결(b), NOESY 스펙트럼의 모식도(c), 검은색 신호가 앞에 존재하는 아미노산의 수소와 뒤에 나오는 아미노산의 HN 사이의 연결을 의미함.

커지면 그에 비례하여 수소 및 질소, 탄소 원자의 수도 증가하게 되며 또한 단백질 크기에 따른 신호선폭의 증가로 인하여 2차원 스펙트럼의 해석이 불가능하다. 따라서 동위원소 표지된 단백질 시료를 이용하여 ^{13}C 와 ^{15}N 핵들과 직접 결합하고 있는 수소들 사이의 정보만을 선택적으로 측정하는 방법이 개발되었으며(triple resonance 실험), 이를 통하여 비교적 간단하게 resonance assignment가 가능하다.

2.8 단백질 구조 연구의 실례: 생체막 유사환경에서의 Crambin 연구

Crambin은 식물 씨앗에서 유래한 소수성 단백질로 모두 46개의 아미노산으로 이루어져 있다. Crambin은 수용액에 전혀 녹지 않기 때문에 이전의 연구에서는 모두 씨앗으로부터 추출한 단백질 시료를 사용하여 NMR 및 X선 연구가 진행되었다. Crambin과 아미노산 서열 및 3차원 구조에서 유사성을 띠는 단백질류는 모두 항생작용을 가지고 있지만 crambin의 경우에는 항생작용을 포함하여 어떠한 기능도 알려지지 않았다. 따라서 단백질의 구조와 엔지니어링을 통한 새로운 항생기능의 발현을 위한 연구가 진행되었다.

Crambin의 NMR 연구를 위하여 동위원소 표지된 단백질 시료를 만들기 위해 저자들은 staphylococcal nuclease라는 단백질을 crambin 앞에 도입하여 대장균내에서 발현시킴으로써 물에 녹지 않아 대량생산이 불가능하였던 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 방법을 개발하였다. 또한 이를 통하여 ^{13}C , ^{15}N 동위원소가 표지된 단백질 시료를 얻을 수 있었다(그림 10).

수용액에 녹지 않는 crambin의 구조를 연구하기 위하여 저자들은 75% 아세톤 수용액과 계면활성제인 dodecylphosphocholine (DPC, 300 mM) 수용액에 단백질 시료를 녹여 NMR 연구를 진행하였다.

2차원 및 3차원 이핵중 NMR 실험을 통하여 crambin의 거의 모든 수소, 탄소, 질소 원자핵의 공명선을 확인하였으며(그림 11), 이를 바탕으로 구조계산에 필요한 NOE assignment를 수행하여 2개의 용액 조건에서 표 1과 같은 수소 간 거리 및 펩타이드 결합의 이면각도에 대한 정보를 수집하였다.

단백질 내의 수소결합에 관한 정보를 3D-long range-HNCO

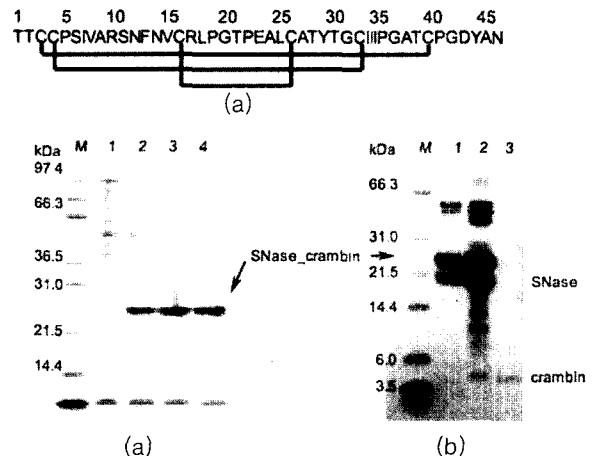


그림 10. Crambin의 아미노산 서열 (a), 대장균 내에서 발현된 crambin의 SDS-PAGE 결과 (b), Reversed-phase HPLC를 이용하여 최종 정제된 crambin (c).

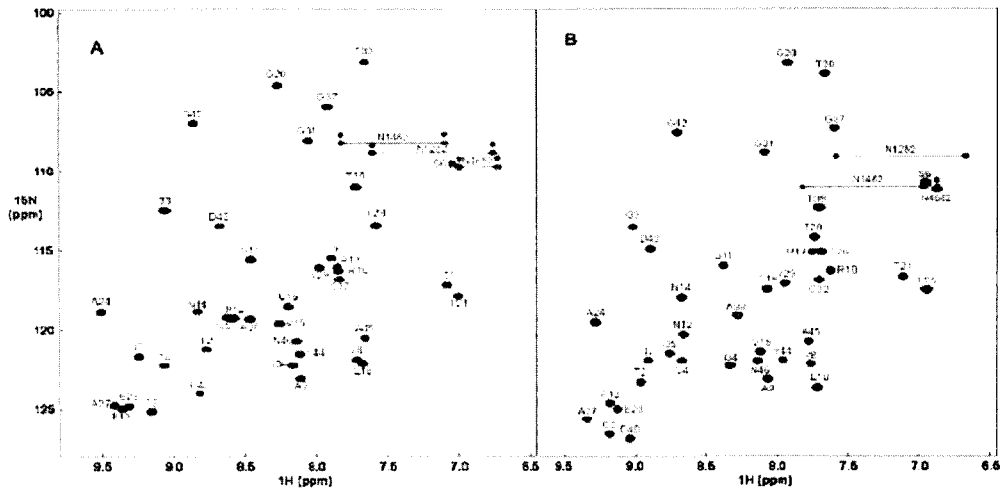


그림 11. Crambin의 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC(heteronuclear single quantum correlation spectroscopy). 75% 아세톤 수용액에서 얻은 스펙트럼 (A)와 300 mM DPC 수용액에서 얻은 스펙트럼 (B), 각각 피크 위에 아미노산의 종류와 서열을 기록하였음.

표 1. Crambin의 3차 구조 계산을 위한 실험 값들 및 구조에 관한 통계

Parameter	Crambin in the mixed solvent ^a	Crambin in DPC micelles ^a
Number of experimental constraints		
NOE distance constraints		
All	539	637
Intraresidue ($i=j$)	139	158
Sequential ($ i-j =1$)	180	211
Medium range ($1 < i-j < 5$)	97	154
Long range ($ i-j \geq 5$)	123	114
Torsion angle constraints (ϕ and ψ)	40	38
Hydrogen bond constraints	38	38
Rmsd from experimental distance restraints (\AA) ^b	0.014 ± 0.001	0.029 ± 0.001
Rmsd from torsion angle constraints ($^\circ$) ^b	0.044 ± 0.055	0.027 ± 0.056
Rmsd from idealized covalent geometry		
Bonds (\AA)	0.002 ± 0.0001	0.003 ± 0.0001
Angles ($^\circ$)	0.550 ± 0.003	0.625 ± 0.010
Improper ($^\circ$)	0.381 ± 0.005	0.439 ± 0.012
Ramachandran plot ^c		
Most favored regions	88.7	79.6
Additionally allowed	10.3	17.7
Generously allowed	1.0	2.0
Disallowed	0.0	0.7
Coordinate precision (\AA)		
Rmsd of backbone atoms to the mean (\AA)	0.79	0.69
Rmsd of all heavy atoms to the mean (\AA)	1.03	1.02
Comparison with the previous structures ^d		
Rmsd with the crystal structure, 1EJG	0.77 (0.60)	0.80 (0.72)
Rmsd with the solution structure, 1CCN	1.15 (0.60)	1.23 (0.67)

^aThe SA ensemble corresponds to the final 20 structures from 100 simulated annealing structures. ^bNone of the structures exhibited interproton distance violations of $> 0.5 \text{\AA}$ or torsion angle violations of $> 5^\circ$. ^cPROCHECK NMR(40) was used for the calculation of Ramachandran statistics. ^dNumbers outside parentheses are backbone rmsd values for the entire molecule and numbers inside parentheses are backbone rmsd values over regions of defined secondary structure (residues 23, 717, 2330, 3334).

(특정 아미노산의 HN과 다른 아미노산의 CO 사이의 관계를 확인하는 실험)를 통하여 수소 결합에 대한 정보를 얻었으며, 수소 간 거리와 펩타이드 결합의 이면각도와 더불어 단백질의 구조 계산에 사용하였다(표 1).

결과적으로 그림 12에서와 같은 crambin의 3차원 구조를 두 가지 용액상태에서 구하였으며 RMSD는 각각 0.79, 0.69 Å이었다

(그림 12).

DPC micelle 수용액은 세포의 생체막 환경을 조성하여 crambin을 안정화시키는 작용을 한다. DPC micelle 수용액에 paramagnetic인 Mn^{2+} 를 첨가하여 단백질 신호의 감소를 추적한 결과 crambin은 DPC micelle에 묻혀있는 것으로 판명되었다. 따라서 crambin은 세포의 생체막에 친화성을 가지는 소수성 단백질로 확

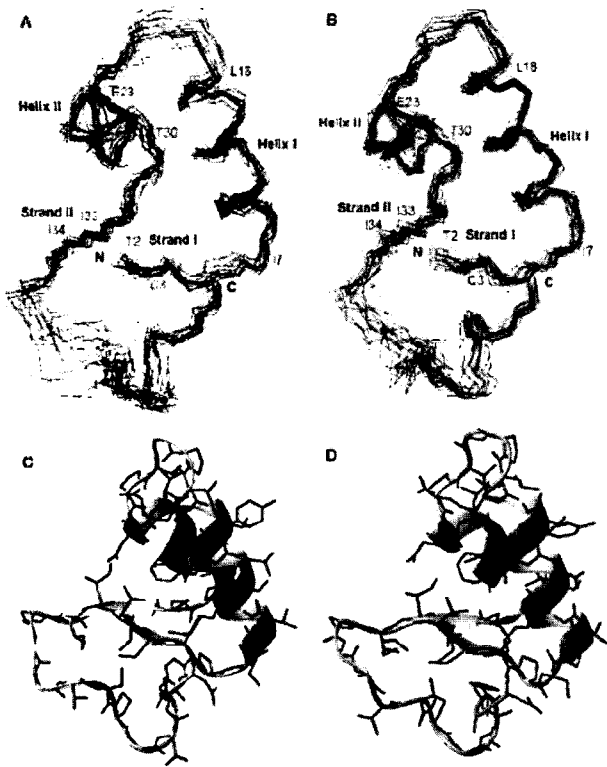


그림 12. Crambin 의 75% 아세톤 수용액 (A, C) 및 DPC micelle 수용액 상태 (B, D)에서의 3 차원 구조.

인되었으며 유사한 단백질류들 역시 생체막에 작용하여 항생기능을 나타낸다는 보고가 이미 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 crambin 의 몇몇 아미노산을 다른 종류의 아미노산으로 치환함으로써 항생 작용을 획득하려는 노력이 시도되고 있다.

3. 결론

본 지상강좌에서는 핵자기공명 분광법을 이용한 생체고분자물질의 연구를 소개하였다. 핵자기공명법은 현재 합성에 의해 만들어진 작은 화합물 또는 천연물 유래 화합물의 화학적 구조 해석을 위해 없어서는 안될 위치를 차지하고 있으며 단백질, 핵산, 다당류등을 비롯한 생체고분자물질의 3차원 구조 연구 및 기능연구, 합성고분자물질의 동정등에 광범위하게 사용되고 있다. 비록 이 지상강좌는 핵자기공명법의 연구를 단백질을 중심으로 서술하였지만 기본원리, 실험방법 및 해석의 과정은 모든 시료에 동일하게 적용 가능하다.

예를 들면 작은 화합물이나 일반 고분자 물질의 경우 인위적인 동위원소 표지없이 자연계에 존재하는 ^{13}C , ^{15}N 을 이용한 이핵종 실험을 통하여 2차원 스펙트럼을 얻을 수 있다. 이러한 실험을 위하여 고농도의 시료가 필요하지만 최근에 개발된 자기장의 세기가 800 MHz 이상인 초고자장 핵자기공명장치와 신호의 감도를 획기적으로 개선시킨 cryogenic probe 등 하드웨어의 개발은 향후 관련분야 연구의 전망을 밝게 한다.

특히, 생체고분자의 연구에 있어서는 하드웨어 측면의 기술적 진보와 더불어 TROSY로 대표되는 측정방법의 개발, 특수 실험을 위한 단백질 시료제조 방법의 개발, 분자생물학에서의 기술진보 및 구조 계산을 위한 소프트웨어 및 컴퓨팅 장치의 눈부신 발전에 힘입어 비교적 작은 크기의 단백질 핵자기공명 분광법을 이용한 구조획득은 점점 일상화되어 가고 있으며 훨씬 더 크고 복잡한 단백질 및 단백질 복합체의 연구로 진화하고 있다.

참고문헌

1. J. Cavanagh, W. J. Fairbrother, A. G. Palmer III, and N.J. Skelton, *Protein NMR Spectroscopy*, Academic Press, San Diego, 1996.
2. W. R. Croasmun and R. M. Carlson, *Two-Dimensional NMR Spectroscopy*, VCH, Weinheim, 1994.
3. A. E. Derome, *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*, Pergamon, Oxford, 1987.
4. R. R. Ernst, G. Bodenhausen, and A. Wokaun, *Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions*, Clarendon Press, Oxford, 1987.
5. J. N. S. Evans, *Biomolecular NMR spectroscopy*, Oxford University Press, Oxford, 1995.
6. M. Goldman, *Quantum Description of High-Resolution NMR in Liquids*, Clarendon Press, Oxford, 1988.
7. M. Karplus and G. A. Petsko, *Nature*, **347**, 631, 1990.
8. M. Sattler and S. W. Fesik, *Structure*, **4**, 1245 (1996).
9. X. Shan, K. H. Gardner, D.R. Muhandiram, N. S. Rao, C. H. Arrowsmith, and L. E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 6570 (1996).
10. K. Wuthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley & Sons, New York, 1986.
11. K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, and K. Wuthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12366 (1997).
12. H.-C. Ahn, N. Juranic, S. Marura, and J. L. Markley, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 4398 (2006).