

Aplicaciones de la RMN a la caracterización de la flexibilidad en proteínas

RESUMEN

Las proteínas son moléculas caracterizadas por un elevado grado de plasticidad que, en presencia de un estímulo pueden llevar a sobrellevar cambios conformacionales muy significativos, de una gran importancia para la transmisión de información en la célula. La detección y caracterización de dichas reorientaciones segmentales representa uno de los grandes retos de la biología estructural actual. La reciente introducción de medios orientadores no interactivos con la proteína ha conducido al diseño de nuevas aplicaciones de la RMN en solución que permiten rescatar la información orientacional contenida en el acoplamiento dipolar. En el presente artículo se pretende demostrar como dicha información puede ser utilizada para una mejor comprensión de los procesos celulares a nivel molecular, y se detallarán algunos ejemplos ilustrativos que han aparecido recientemente en la literatura.

LAS PROTEÍNAS SON ENTIDADES INTRÍNECAMENTE FLEXIBLES

La unidad básica de los organismos vivos, la célula, se caracteriza por un elevado grado de organización y un flujo muy específico de energía e información. Con la importante excepción del ADN que es el portador de la información necesaria para la replicación celular mediante el famoso código genético, la transferencia de información en la mayoría de los procesos celulares se realiza a nivel de proteínas. Las proteínas pueden albergar y transferir dicha información gracias a su plasticidad: la capacidad de modificar, de manera reversible, su conformación en respuesta a un estímulo externo¹. Del conjunto de proteínas que componen el metabolismo, cabe destacar a los enzimas que, producto de la evolución, están provistos de la configuración tridimensional adecuada para la óptima unión de sustratos y su posterior conversión en productos de una manera eficiente, rápida y estereoespecífica. A pesar de que buena parte de la eficiencia de éstas formidables maquinarias catalíticas se debe a la complejidad de su arquitectura molecular, nuevamente aquí se requiere un importante grado de flexibilidad conformacional para poder ejercer su función biológica: la energía liberada



Oscar Millet

Plataforma de RMN de Biomolècules,
Parc Científic de Barcelona
Josep Samitier 1-5, Barcelona 08028
Telf. 934037132 Fax: 934037114
e-mail: omillet@pcb.ub.es

en la unión y/o en la transformación del ligando ha de ser suficiente para producir el encaje inducido del sustrato (responsable último de la catálisis enzimática) y las transformaciones conformacionales en la biomolécula (p. ej. cambios alostéricos)^{2,3}. Las proteínas en la estructura nativa tan sólo son marginalmente más estables que en su forma desnaturalizada y la movilidad de las proteínas es una consecuencia natural de las fuerzas débiles que conforman la estructura

terciaria de las proteínas (interacciones que se pueden romper y recomponer fácilmente en condiciones fisiológicas).

Esta flexibilidad conformacional se manifiesta en múltiples facetas que abarcan diferentes amplitudes y escalas de tiempo. A pesar de su complejidad intrínseca, existe un creciente interés por entender los mecanismos que inducen la presencia de movilidad y sus repercusiones en la función biológica. Existen algunos casos en la literatura en los que se ha correlacionado la velocidad de intercambio entre conformaciones accesibles por parte de unos pocos átomos (derivadas del movimiento térmico en la escala del μs - ms) con la actividad catalítica de un enzima determinado⁴ pero, en general, se requieren movimientos concertados que involucran a un elevado número de residuos para poder establecer una clara correlación entre dinámica y función biológica⁵. Así pues, los reordenamientos conformacionales que implican a una gran cantidad de átomos, por ejemplo un dominio entero, suelen ser de una gran importancia funcional. Este interés no se limita tan solo al campo de la ciencia básica, sino que los extraordinarios cambios estructurales provocados por la reorientación de dominios, por ejemplo al reconocer a su efector, suelen producir a su vez variaciones en determinadas propiedades espectroscópicas. Este fenómeno ha sido ampliamente aprovechado para el diseño de biosensores específicos de metabolitos en muestras biológicas⁶.

Debido a su significado biológico, la flexibilidad interdominio ha captado un especial interés por parte de la comunidad científica. A partir de datos recabados de la literatura, Chothia y colaboradores han establecido una

clasificación de la movilidad interdominio, dividiéndolos en dos grandes categorías: movimiento de bisagra y movimiento de cizalla⁷. En el movimiento de cizalla, la dirección de movimiento está contenida en el plano que forma la interficie de los dos segmentos que se desplazan, mientras que en el movimiento de bisagra, la dirección de movimiento es perpendicular a dicho plano (ver **Figura 1**). Así por ejemplo, la citrato sintasa representa uno de los ejemplos más espectaculares de movimientos interdominio del tipo cizalla: el enzima consta de dos dominios que están en contacto a través de una extensa interficie. La cercanía de un sustrato activa el mecanismo de cizalla entre los pares de hélices empaquetadas. La suma de los efectos locales produce un desplazamiento total de 10Å, suficiente para secuestrar el sustrato en el interior de la proteína. Por otra parte, las proteínas bacterianas de unión periplásmica constituyen ejemplos arquetípicos de reorientaciones del tipo bisagra. Estas proteínas son las encargadas de reconocer gran variedad de efectores, desde azúcares hasta iones metálicos y constan de dos dominios unidos por un conector que hace las veces de bisagra. En presencia del sustrato los dominios se cierran y el ligando queda atrapado en el interior. Esta clasificación binomial de los movimientos interdominio se ha extendido y jerarquizado en base a criterios estructurales más sutiles, en una iniciativa del grupo del Prof. Gerstein de la Universidad de Yale, a la que se puede acceder libremente a través de internet (<http://molmovdb.mbb.yale.edu/molmovdb/>).

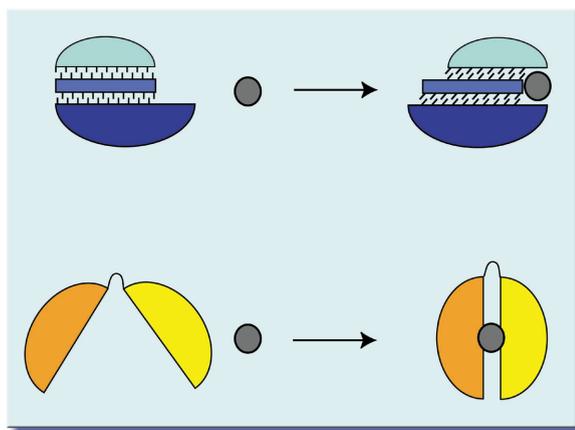


Figura 1: representación esquemática de los dos tipos de movimiento interdominio activados por la unión del sustrato: movimiento de cizalla (arriba, tonos fríos) y movimiento de bisagra (abajo, tonos cálidos).

La mayor parte de la información compilada hasta el momento acerca de los mecanismos de la orientación segmental proviene del análisis de estructuras de rayos X de proteínas en al menos dos estados conformacionales diferentes⁸. La cristalografía de rayos X es la técnica más poderosa para la elucidación estructural de biomoléculas, siendo la herramienta escogida para la resolución de aproximadamente el 85% de las estructuras depositadas durante 2003 en el PDB. No obstante, su aplicación para la caracterización de procesos de movilidad segmental se ve limitada por la presencia de las fuerzas de empaquetamiento cristalino

que pueden comprometer la bondad de los resultados, muy especialmente en los casos en los que las diferentes conformaciones tienen estabilidades comparables. Esto deja a la resonancia magnética nuclear (RMN) como la única técnica de alta resolución para realizar dichos estudios, ya que, si bien existen otras técnicas como la dispersión de rayos X de bajo ángulo⁹ o el difracción circular¹⁰, no son técnicas de resolución atómica y su aplicación se limita a la identificación de la presencia de reordenamientos parciales en la molécula. La RMN presenta la ventaja adicional de que es una técnica en solución de manera que se puede estudiar la influencia que el disolvente pueda mostrar en la conformación. El principal inconveniente reside en el tamaño del sistema a estudiar, que viene dado por las limitaciones de la técnica experimental y que actualmente se sitúa alrededor de los 50 KDa.

ESTUDIOS DE LA MOVILIDAD SEGMENTAL POR RMN

La aplicación de la RMN al estudio de la movilidad segmental en general e interdominio en particular requiere de la obtención de una serie de observables experimentales para cada residuo, pudiendo ser medidas de relajación del espín nuclear¹¹ o medidas del acoplamiento dipolar¹². En el presente artículo tan sólo se detallan los experimentos de RMN basados en el acoplamiento dipolar, que es la técnica que proporciona unos resultados más exactos y precisos. Sin embargo, el tratamiento de los datos experimentales es completamente análogo al que se realiza con las medidas de relajación.

Acoplamiento dipolar. Cada espín nuclear (por ejemplo, el correspondiente al núcleo de un nitrógeno amida) genera un campo magnético, que se orienta en función de la dirección del momento de espín magnético de dicho núcleo (ver **Figura 2a**). El espín nuclear de un segundo núcleo en las proximidades (p.ej. el protón amida) se verá afectado por la presencia del campo magnético del nitrógeno. Evidentemente, el efecto es mutuo ya que el espín nuclear del protón también creará un campo magnético que interactuará asimismo con el espín nuclear del nitrógeno. El resultado es que se establece una interacción entre dipolos denominada *acoplamiento dipolar*. Desde el punto de vista de la biología estructural, dicho acoplamiento es de enorme interés ya que proporciona valiosa información acerca de la disposición espacial relativa de los dos átomos. Por una parte es función de la distancia que separa a los dos núcleos que interactúan (r en la notación de la **figura 2b**). Los experimentos de efecto nuclear overhauser (NOE) se basan en medir las interacciones dipolares entre núcleos distantes para establecer conexiones espaciales que, en última instancia, permitan establecer las estructuras tridimensionales de la biomolécula en solución. No obstante, en el caso que consideramos ahora, el protón amida está covalentemente unido al nitrógeno amida a través de un enlace y esta distancia es fija y conocida. En este caso, la información estructural del acoplamiento dipolar

proviene de su dependencia con la orientación respecto a un eje externo fijo (el eje principal del campo magnético externo B_0 , ángulo θ en la **figura 2b**). En solución, el movimiento isotrópico de las moléculas hace que las interacciones dipolares promedien a cero. Por otra parte, en el estado sólido la falta de difusión rotacional hace que cada núcleo presente una orientación fija respecto al campo externo de manera que el acoplamiento dipolar se manifiesta en su totalidad. La contrapartida es que el espectro resultante es de una gran complejidad produciéndose también un gran ensanchamiento de señales. Una solución óptima para estudios en solución se obtendría si la molécula pudiera desarrollar una orientación preferente con respecto al campo magnético externo. En este caso la interacción dipolar no se extinguiría totalmente manteniendo la información estructural pero sin aumentar mucho la complejidad del espectro. Recientemente esto se ha conseguido al introducir en la muestra un elemento adicional que actúa como medio orientador: estas sustancias suelen ser de geometría anisotrópica y con una composición química muy repetitiva, de manera que presentan una muy elevada anisotropía de susceptibilidad magnética. Esto hace que el elemento orientador se alinee en presencia de campos magnéticos (ver **Figura 3**) produciendo una difusión rotacional anisotrópica en las moléculas disueltas en este medio, reestableciendo una fracción de la interacción dipolar (constante dipolar residual o CDR) que contiene la información angular. Afortunadamente, en general no se produce una interacción específica entre la proteína y el medio orientador que podría afectar a las propiedades y a la solubilidad de la biomolécula (ver la expansión en la **Figura 3**). Los elementos orientadores descritos en la literatura incluyen las bicelas lipídicas¹³, los fragmentos de moléculas altamente anisotrópicas como virus bacteriófagos^{14,15} o los fragmentos de membrana púrpura¹⁶. Una elegante alternativa consiste en aprovechar las propiedades de los sitios de unión a determinados cationes que algunas proteínas poseen y conseguir el alineamiento de la biomolécula sustituyendo el ión por un ión paramagnético (típicamente de la familia de los lantánidos, p. ej. terbio o yterbio)^{12,17}.

Medida del acoplamiento dipolar por RMN. La **Figura 4** muestra un espectro de correlación ^1H - ^{15}N característico de una proteína. En cada eje se representa el desplazamiento químico de cada núcleo de manera que, una vez asignado, cada pico en el espectro se identifica unívocamente con un grupo amida de la proteína (existen numerosos experimentos descritos en la literatura que permiten la asignación de dichos picos). Este experimento de correlación constituye la base sobre la que se pueden establecer modificaciones que permitan medir propiedades de la proteína, codificadas en la intensidad del pico o, como es el caso de la constante dipolar residual, en pequeñas pero apreciables variaciones en el desplazamiento químico (ver cuadro insertado en la **Figura 4**). El resultado final es una serie de valores de la constante dipolar residual (CDR) para cada uno de los vectores N-H de la proteína.

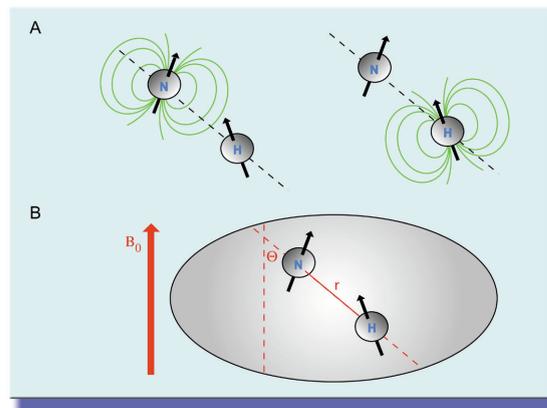


Figura 2: A) representación gráfica del campo producido por los dipolos de los núcleos de hidrógeno y nitrógeno en presencia de un campo magnético externo. B) Parámetros estructurales que se pueden extraer a partir de la información del acoplamiento dipolar.

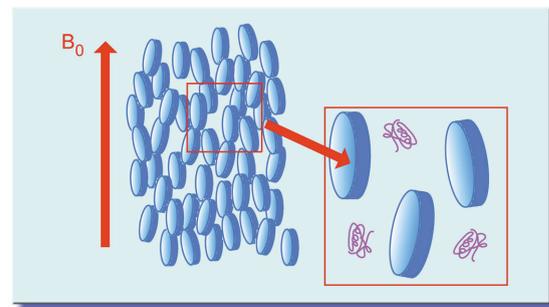


Figura 3: alineamiento de las bicelas lipídicas en presencia de un campo externo (B_0). Cuadro: no hay interacción entre las bicelas (azul) y la proteína (magenta), generalmente.

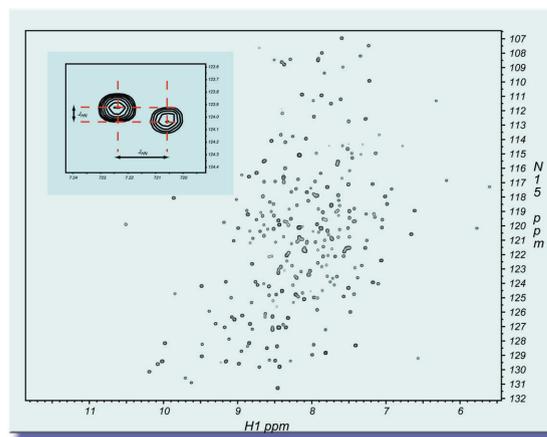


Figura 4: espectro de correlación ^1H - ^{15}N de una proteína de 30 KDa. Cuadro: la información del acoplamiento dipolar puede extraerse midiendo los desplazamientos en la señal en el espectro de correlación.

Análisis de las CDRs. El problema que nos compete es el de la caracterización estructural de la reorientación segmental en una biomolécula provocada, por ejemplo, por un efector externo. La orientación relativa de los diferentes dominios de una proteína puede haberse visto afectada por la presencia de un ligando, o un segmento de una molécula de DNA puede haber cambiado su geometría por la presencia de un ión metálico. Imaginemos que disponemos de una colec-

ción de medidas experimentales de CDRs para una proteína en presencia del ligando, determinadas a partir de los experimentos descritos en el apartado anterior. Disponemos asimismo de una estructura de alta resolución de la apo-proteína y queremos estimar como cambia la orientación relativa de los dos dominios al unir dicho sustrato. La estructura de la forma apo se utilizará como punto de partida para simular un conjunto de constantes dipolares residuales consistentes con la orientación interdominio de la apo-proteína. Tal y como se observa en la **Figura 5a**, una pobre correlación entre los datos experimentales y los simulados puede ser indicativo de la existencia de una orientación interdominio diferente. A partir de aquí se aplica una aproximación en la que considera a cada dominio como un sólido rígido¹⁸. La orientación relativa de dos vectores amida que pertenecen a un mismo dominio está fijada y la información que proporcionan es complementaria. El conjunto de vectores amida de cada dominio permite establecer con alta precisión la posición de dicho dominio con respecto al campo externo, de manera que también se obtiene la orientación relativa entre los dos dominios¹⁹. A nivel práctico, estos cálculos se realizan por ordenador, aplicando los mismos programas para el refinamiento de estructuras basados en un campo de fuerza, mediante la técnica de *simulated annealing*. El resultado final es una estructura de alta resolución, compatible con los valores de CDRs experimentales, que muestra la orientación interdominio de la proteína en las condiciones en las que se han medido los acoplamientos (forma ligada en nuestro ejemplo).

EJEMPLOS DE APLICACIÓN DE LAS CDRs EN BIOLOGÍA ESTRUCTURAL

A pesar de su novedad (los primeros estudios de orientación en proteínas para obtener CDRs se llevaron a cabo en 1995 y la primera utilización de cristales líquidos diluidos en 1997), existe un gran número de aplicaciones de las CDRs en biología estructural. A continuación se detallarán algunos ejemplos de cómo las CDRs han permitido ayudar a resolver problemas relacionados con la orientación relativa de dominios y también en el campo de las interacciones proteína-proteína.

Cabe resaltar sin embargo que las CDRs no se limitan al estudio de proteínas sino que existen otras aplicaciones descritas incluyen el análisis de los cambios estructurales de fragmentos de RNA²⁰, y en ribozimas²¹ como respuesta a iones. También cabe destacar las enormes implicaciones del uso de CDRs como herramienta para el refinamiento de estructuras en solución. En este caso se refiere al lector a los excelentes artículos de revisión publicados en la literatura^{22,23}

Orientación de dominios. En bacterias gram positivas, los metabolitos e iones son reconocidos en el espacio periplásmico por un conjunto de receptores proteicos que forman la denominada familia de proteínas de unión (bidominio) periplásmica. Existen receptores específicos para los distintos aminoácidos, para dife-

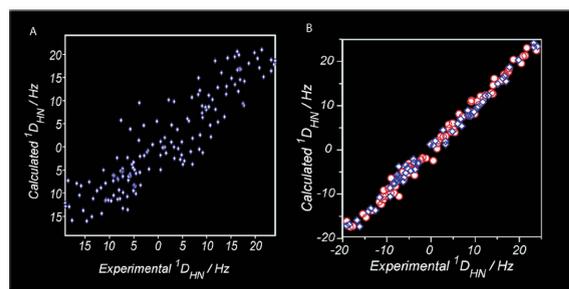


Figura 5: A) correlación entre las CDRs experimentales y las calculadas para la apo-proteína, donde se observa claramente la pobre correlación entre los datos. B) La estructura tridimensional derivada del análisis de las CDRs es totalmente consistente con los valores experimentales.

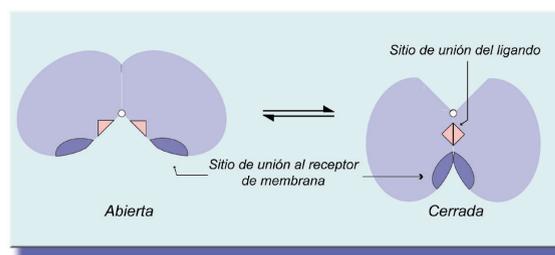


Figura 6: representación esquemática del equilibrio entre las formas abierta y cerrada y localización de los sitios de unión para la familia de proteínas de unión bidominio periplásmicas.

rentes tipos de oligosacáridos y para determinados cationes metálicos y aniones. A pesar de que las proteínas difieren entre sí en la secuencia y el número de aminoácidos que las componen, todas ellas presentan una serie de características comunes: están compuestas de dos dominios unidos por un conector más o menos flexible que permite un equilibrio entre una forma abierta y otra cerrada (ver **Figura 6**). Dicho equilibrio se desplaza completamente hacia la forma cerrada por la unión del ligando, y se cree que en esta conformación se genera un segundo sitio de unión, que es reconocido por el receptor de membrana, permitiendo activar los procesos de transducción de señal y de transporte. No obstante, ¿existe una población significativa de la conformación cerrada en ausencia de ligando?. Esta pregunta es muy relevante desde el punto de vista funcional puesto que es muy probable que dicha isoforma se uniera al receptor de membrana, generando una señal espúrea. Con el fin último de esclarecer este interrogante, se han llevado a cabo estudios estructurales por RMN en solución de la proteína periplásmica de unión a maltosa en su variante de *E. coli*²⁴. Este trabajo partió de una serie de mutaciones de dicha proteína descritas en la literatura que mostraban evidencias experimentales que sugerían que la orientación entre los dos dominios de la proteína podría verse afectada por la mutación²⁵. Se midieron las CDRs en cinco mutaciones de la proteína en presencia de virus bacteriófago como medio orientador y se obtuvieron estructuras de alta resolución a partir del protocolo descrito en el apartado anterior. Tal y como se aprecia en la **figura 7**, las estructuras de las diferentes mutaciones representan instancias de la coordinada conformacional del

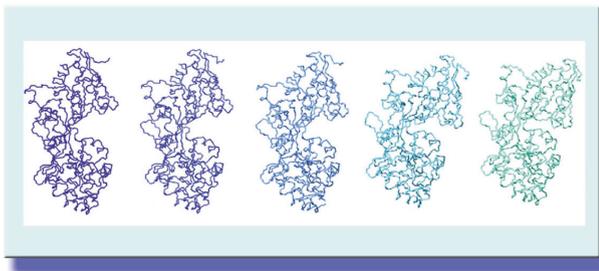


Figura 7: estructuras de alta resolución obtenidas a partir del análisis de CDRs para la proteína que une a maltosa (ver texto). La orientación del dibujo es tal que permite ver el progresivo cierre de los dos dominios.

proceso de cierre de los dos dominios, constituyendo un claro ejemplo de un movimiento interdominio del tipo bisagra. Las medidas de la estabilidad relativa para cada uno de los mutantes han permitido establecer que la proteína se inestabiliza linealmente a medida que se cierran los dos dominios, hasta el punto que la forma cerrada es inestable en ausencia de ligando. Este resultado ha permitido profundizar en la comprensión a nivel molecular del mecanismo de transferencia de señal en la familia de proteínas de unión bidominio. El análisis de las estructuras obtenidas ha permitido establecer una hipótesis sobre las causas de dicha desestabilización, que se atribuye a un aumento progresivo en la superficie hidrofóbica expuesta al disolvente a medida que se cierran los dos dominios.

La proteína lisozima T4 de bacteriófago es una endomuramidasa utilizada por el fago para romper la pared de peptidoglicano de la célula en los últimos estadios del proceso de infección. El enzima hidroliza una unión glicosídica entre dos componentes del sustrato peptidoglicánico. En ausencia de ligando, la apo-proteína cristaliza en una conformación muy parecida a la de la forma ligada. No obstante, debido al gran tamaño del sustrato, desde un principio se sugirió que los dos dominios deberían abrirse para poder albergar el voluminoso sustrato en su interior. Un detallado análisis de la extensa librería de estructuras cristalográficas obtenidas para diferentes mutantes del lisozima T4 muestran especies que difieren hasta 50 grados en la orientación relativa de los dos dominios, con una gran variedad entre ellos, permitiendo establecer que la proteína sobrelleva una gran flexibilidad conformacional a nivel de dominio²⁶. Finalmente, un estudio basado en el análisis de CDRs constató que la proteína lisozima T4, oscila entre sus conformaciones abierta y cerrada en solución²⁷ y se estableció en el mismo trabajo que la forma abierta en solución dispone los dos dominios en una configuración 17 grados más abierta que su equivalente cristalográfico de la proteína silvestre. Esta configuración es compatible con la entrada del sustrato. Las discrepancias entre las configuraciones obtenidas por RMN y por rayos X se han atribuido a las fuerzas de empaquetamiento presentes en el entorno cristalino.

Cabe destacar que en este trabajo se llevaron a cabo precisas mediciones de CDRs en presencia de cinco medios orientadores diferentes y que en todos ellos se

obtuvo la misma orientación interdominio (con una desviación máxima de 3 grados). Este es un importante resultado, ya que indica que la orientación relativa de segmentos de una proteína flexible no se ve afectada por la presencia del medio orientador.

La presencia de movilidad interdominio también ha sido caracterizada por RMN en la peptidil-prolil isomerasa Pin 1²⁸. Dicha proteína está compuesta por un dominio WW enlazada a un dominio tipo FKBP mediante un conector flexible de doce residuos. La medida de CDRs se ha combinado con precisos datos de relajación heteronuclear y simulaciones hidrodinámicas para establecer que el dominio WW (tres veces más pequeño que el dominio FKBP) se comporta como un segmento flexible. Este comportamiento dinámico se puede modular mediante la unión de diversos ligandos naturales: se han estudiado tres sustratos que restringen de manera progresiva la movilidad sugiriendo un posible acoplamiento entre movilidad y función biológica.

Interacciones proteína-proteína y unión de ligandos a proteína. Un profundo conocimiento de las interacciones proteína-proteína resulta de extrema importancia para establecer los mecanismos de comunicación e integración intracelulares y para su posterior aplicación en medicina y biotecnología. No obstante, su caracterización requiere de la co-cristalización del complejo y posterior elucidación estructural o, en caso de trabajar en solución, de tediosos experimentos de RMN que involucran la medida y asignación de un importante número de NOEs intermoleculares. Muy recientemente, Clore y colaboradores, basándose en estudios publicados anteriormente²⁹, han demostrado que la metodología de CDRs puede aplicarse con éxito para una rápida caracterización estructural de las interacciones proteína-proteína³⁰. La información acerca de la orientación relativa de las dos proteínas las proporcionan las CDRs, que son complementadas con un mapa de cambios en los desplazamientos químicos derivados de la complejación, que se transforman en restricciones intermoleculares de distancia. El conjunto de datos ha permitido establecer la primera estructura de un complejo en el sistema de fosfotransferasas bacteriano: el complejo entre el enzima I y la proteína fosfotransportadora HPr. El sistema de transferencia de fosforilo es de una enorme importancia ya que está involucrado en numerosas vías de transducción de señal.

Un caso particular de la interacción proteína-proteína corresponde a los procesos de autoasociación, que adquieren mucha importancia en el caso de enzimas con control alostérico. Así, la hemoglobina tiene una estructura cuaternaria de tetrámero (con simetría C_4), de manera que la unión de un primer ligando al complejo proteico provoca un cambio conformacional en la unidad de proteína que alberga el sitio de unión ocupado, que se transmite al resto de unidades alterando su afinidad por el ligando (alosterismo). Recientes estudios mediante el uso de CDRs han permitido establecer que

la conformación en solución de esta importante molécula es de hecho un equilibrio entre dos conformaciones, la forma R y la forma R2, que previamente habían sido caracterizadas por cristalografía de rayos X³¹. Este resultado demuestra la complementariedad del análisis de CDRs en solución con la cristalografía de proteínas de alta resolución para caracterizar transiciones conformacionales en proteínas.

Finalmente cabe destacar que una importante aplicación de las CDRs consiste en la caracterización estructural de un ligando unido a una proteína. Esta aplicación ha atraído el interés de la industria farmacéutica³², ya que la obtención de estructuras de muy alta resolución de complejos proteína-ligando y enzima-inhibidor permite establecer las complementariedades de forma y carga y resultan cruciales en el desarrollo de nuevos fármacos. Cuando estos estudios se realizan en solución, las constantes dipolares residuales aportan

valiosa información acerca de la orientación relativa proteína/ligando, muy difícil de acceder a partir de la medida de NOEs intermoleculares.

CONCLUSIONES

La introducción de métodos experimentales que posibilitan la medida de las constantes dipolares residuales ha comportado una pequeña revolución en los estudios de la biología estructural en solución. Tal y como se ha visto, la información que proporcionan es fundamentalmente orientacional siendo totalmente complementaria a las medidas basadas en el efecto nuclear Overhauser (NOE) que presentan un marcado carácter direccional. También cabe destacar que algunas de las aplicaciones presentadas en este artículo muestran la potencia de establecer sinergias entre la cristalografía de rayos X y las técnicas en solución. Cuando nos adentramos en la era de la genómica estructural, cabe esperar multitud de aplicaciones de este potente método en el futuro.

REFERENCIAS

1. En: Fersht, A. *Structure and Mechanism in Protein Science*. 1998. Freeman and Company, New York.
2. Tsou, C.L. *Ann. NY Acad Sci.*, **1998**, *864*, 1-8.
3. Hammes, G. G. *Biochemistry*, **2002**, *41*, 8221-8228.
4. Eisenmesser, E. Bosco, D., Akke, M., Kern, D. *Science*, **2002**, *295*, 1520-1523.
5. Koshland, D.E.; Nemethy, G.; Filmer, D. *Biochemistry*, **1966**, *5*, 365-385.
6. Dwyer, M.A.; Hellinga, H. W. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2004**, *14*, 495-504.
7. Gerstein, M.; Lesk, A. M.; Chotia, C. *Biochemistry*, **1994**, *33*, 6739-6749.
8. Gerstein, M.; Echols, N. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2004**, *8*, 14-19.
9. Vachette, P.; Koch, M.H.J.; Svegún, D.I. *Methods Enzymol.* **2003**, *374*, 584-615.
10. Greenfield, N. J. *Methods Enzymol.* **2004**, *383*, 282-317.
11. Fushman D.; Varadan, R.; Assfalg, M.; Walker, O. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **2004**, *44*, 189-214.
12. Tolman, J. R.; Flanagan, J.M.; Kennedy, M.A.; Prestegard, J.H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, *92*, 9279-9283.
13. Tjandra, N.; Bax, A.D. *Science*, **1997**, *278*, 1111-1114.
14. Hansen, M.R.; Mueller, L.; Pardi, A. *Nat. Struct. Biol.*, **1998**, *5*, 1065-1068.
15. Clore, G.M.; Starich, M.R.; Gronenborn, A.M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 10571-10572.
16. Koenig, B.; Hu, J. S.; Ottiger, M.; Bose, S.; Hendler, R.; Bax, A.D. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 1385-1386.
17. Contreras, M.A.; Ubach, J.; Millet, O.; Rizo, J.; Pons, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 8947-8948.
18. Skrynnikov, N.R.; Goto, N. K.; Yang, D.; Choy, W.Y.; Tolman, J.R.; Mueller, G.A.; Kay, L.E. *J. Mol. Biol.*, **2000**, *295*, 1265-1273.
19. Evenas, J.; Tugarinov, V.; Skrynnikov, N.R.; Goto, N.K.; Muhandiram, R.; Kay, L.E. *J. Mol. Biol.*, **2001**, *309*, 961-974.
20. McCallum, S.A.; Pardi, A. *J. Mol. Biol.*, **2003**, *326*, 1037-1050.
21. Bondsgaard, K.; Mollova, E.T.; Pardi, A., *Biochemistry*, **2002**, *41*, 11532-11542.
22. De Alba, E.; Tjandra, N. *Prog. Nuc. Mag. Reson. Spectrosc.*, **2002**, *40*, 175-197.
23. Blackledge, M. *Prog. Nuc. Mag. Reson. Spectrosc.*, **2004**, *46*, 23-61.
24. Millet, O.; Hudson, R.H.; Kay, L.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*, 12700-12705.
25. Marvin, J.S.; Hellinga, H.W. *Nat. Struct. Biol.*, **2001**, *8*, 795-798.
26. Zhang, X.J.; Wozniak, J.A.; Matthews, B.W. *J. Mol. Biol.*, **1995**, *250*, 527-552.
27. Goto, N.K.; Skrynnikov, N.R.; Dahlquist, F.W.; Kay, L.E. *J. Mol. Biol.*, **2001**, *308*, 745-764.
28. Jacobs, D.M.; Saxena, K.; Vogtherr, M.; Bernado, P.; Pons, M.; Fiebig, K. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *28*, 26174-26182.
29. McCoy, M.A.; Wyss, D.F. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 11758-11763.
30. Clore, G.M.; Schwieters, C.D. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 2902-2912.
31. Lukin, J.A.; Kontaxis, G.; Simplaceanu, V.; Bax, A.; Ho, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*, 2, 517-520.
32. Olejniczak, E.T.; Meadows, R.P.; Wang, H.; Cai, M.; Nettekheim, D.G.; Fesik, S.W. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9249-9250.