

## **ESTRUCTURA DE PROTEÏNES PER RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR AMB LA UTILITZACIÓ D'ACOBLAMENTS DIPOLARS RESIDUALS**

MIQUEL PONS

*Departament de Química Orgànica, Universitat de Barcelona.*

Adreça per a la correspondència: Miquel Pons. Departament de Química Orgànica. Universitat de Barcelona. Carrer de Martí i Franquès, 1-11. 08028 Barcelona. Adreça electrònica: [mpons@qo.ub.es](mailto:mpons@qo.ub.es).

*Paraules clau: RMN, acoblaments dipolars, anisotropia, orientació, estructura de proteïnes.*

*Keywords: NMR, dipolar couplings, anisotropy, orientation, protein structure.*

### **RESUM**

La determinació de l'estructura de proteïnes per mitjà de la ressonància magnètica nuclear ha experimentat un salt important amb la introducció de l'ús de les constants d'acoblaments residuals mesurades en mostres parcialment orientades. Aquestes mesures proporcionen informació angular a llarga distància que complementa la informació de curta distància derivada dels nOe. Aquesta informació millora la precisió de les estructures obtingudes i, en general, millora la concordança entre les estructures de ressonància magnètica nuclear i les obtingudes per difracció de raigs X. També són especialment importants en l'estudi de proteïnes amb diversos dominis, en els quals la seva orientació relativa és difícil d'obtenir per mètodes convencionals de RMN, i que sovint està afectada per l'empaquetament cristallí. Els acoblaments dipolars residuals són prometedors per a la determinació ràpida d'estructures en el context dels projectes de genòmica estructural. Els acoblaments dipolars residuals contenen també informació sobre la dinàmica en escales de temps que arriben als mil·lisegons.

### **SUMMARY**

The use of residual dipolar couplings has had an enormous impact on the determination of protein structures by NMR. Residual dipolar couplings can be measured in partially

oriented molecules and provide long-range angular information that is complementary to that obtained from nOe measurements.

Residual dipolar coupling restraints lead to more precise structures and, in general, closer to those obtained by X-ray. On the other hand, residual dipolar couplings provide information that allows the determination of the relative orientation of domains in multidomain proteins in solution. This information is difficult to obtain by conventional NMR methods and is often affected by crystal packing. Residual dipolar couplings show promise in high-throughput structure determinations in the context of structural genomics projects. Dynamic information contained in residual dipolar couplings extends to the millisecond timescale, that is not well characterized by relaxation measurements.

## INTRODUCCIÓ. DETERMINACIÓ D'ESTRUCTURES DE MACROMOLÈCULES PER RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR

La ressonància magnètica nuclear (RMN) és una tècnica ben establerta per a la determinació de l'estructura tridimensional de macromolècules que, en contrast amb les tècniques de difracció, no requereix l'obtenció de cristalls. Aquesta afirmació denota una diferència que va més enllà d'una qüestió experimental i reflecteix les profundes diferències en la forma com les dues tècniques —RMN i difracció de raigs X— aconseguen extreure la informació sobre la distribució espacial dels àtoms que componen la macromolècula estudiada.

En una mostra cristallina la informació s'extreu de les dades obtingudes a partir d'experiments en què es mesura la difracció d'un feix de radiació que incideix en una direcció ben definida respecte al cristall i, per tant, respecte a les molècules que formen la xarxa cristallina. Tots i cada un dels punts de la xarxa cristallina contribueixen a les intensitats dels feixos difractats i la seva anàlisi proporciona una imatge global de la distribució de la densitat electrònica que permet, finalment, localitzar la posició dels àtoms i deduir l'estructura tridimensional de la molècula.

També, en un experiment clàssic de RMN, les molècules es troben totalment desordenades i en constant moviment isotròpic, és a dir, sense direccions preferents en el si de la dissolució. Això implica que la informació estructural no pot provenir de mesures que impliquin una direcció externa, com en el cas de la difracció de raigs X, sinó que s'ha de basar en relacions internes, dins de la molècula, que es mantenen constants en el temps tot i que la molècula pugui girar o moure's en qualsevol direcció dins de la dissolució. Aquestes relacions poden ser les distàncies entre dos àtoms o els angles definits per tres o més àtoms.

Diferents paràmetres mesurables amb la utilització d'experiments de RMN contenen informació geomètrica rellevant: l'efecte nuclear Overhauser (nOe) depèn, entre altres coses, de la distància entre parells de nuclis, i les constants d'acoblament escalars a tres enllaços depenen de l'angle diedre definit pels quatre nuclis implicats. De l'anàlisi dels corresponents experiments de RMN, se n'extreu un gran nombre d'aquestes relacions que corresponen a restriccions que l'estructura correcta de la macromolècula ha de complir. Coneguda la connectivitat (l'estructura primària) aquest conjunt de restriccions només el pot complir un conjunt d'estructures, idealment molt properes entre elles, que defineixen «l'estructura» tal com la veu la RMN.

El grau de definició de l'estructura depèn de la fracció de l'espai conformacional de la macromolècula que aquestes restriccions permeten descartar. L'observació d'efecte nOe entre nuclis que es troben allunyats entre si a la seqüència és especialment important a l'hora de definir el plegament de la macromolècula. Malauradament, les característiques del procés físic que origina l'nOe fan que la seva intensitat decreixi molt ràpidament amb la distància i que la seva observació sigui impossible si els nuclis implicats estan separats per més de quatre o cinc Angstroms. Així, la informació sobre el plegament global de la proteïna s'obté a partir d'observacions de caràcter local. En el cas d'estructures globulars, l'existència d'una xarxa espessa de restriccions assegura una bona descripció de la forma global. A més, per a estructures esteses, en què els contactes directes només tenen lloc entre un nombre reduït d'àtoms, l'acumulació d'errors, o bé la simple absència de dades pot donar lloc a estructures que, tot i ser localment correctes, no proporcionen una bona definició de l'estructura global. En el camp de les proteïnes, això passa sovint en el cas d'estructures multidomini en què els contactes entre els diferents dominis poden ser limitats i difícils de detectar.

### L'ACOBLAMENT DIPOLAR

La interacció dipolar entre dos nuclis amb moment magnètic no nul s'origina per l'efecte que el camp magnètic local generat per cada un dels nuclis té sobre l'altre. En el cas d'un parell de nuclis amb espín 1/2, que poden existir en dos estats ( $\alpha$  i  $\beta$ , que podem associar a un moment magnètic dirigit a favor o en contra del camp extern) aquesta interacció es manifesta experimentalment com un desdoblament del senyal de RMN dels dos nuclis. Aquesta interacció depèn de l'invers del cub de la distància i, atès que el

moment magnètic de cada un dels nuclis està sempre dirigit en la direcció del camp magnètic extern, també de l'orientació del vector internuclear respecte al camp extern.

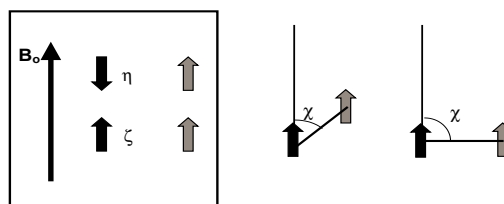


FIGURA 1. L'acoblament dipolar. La freqüència dels senyals de RMN depèn de la diferència d'energia entre els estats  $\alpha$  i  $\beta$ . Si hi ha un nucli proper, la diferència d'energia serà diferent si aquest veï es troba en l'estat  $\alpha$  o  $\beta$ , i això origina un desdoblament dels senyals. L'acoblament disminueix amb la distància i depèn de l'angle entre el vector internuclear i el camp extern.

### INTERACCIONS ANISOTRÒPIQUES

Si bé la RMN s'aplica majoritàriament a mostres líquides, és possible també mesurar espectres de mostres sòlides utilitzant tècniques especials. La RMN de mostres sòlides posa de manifest que la major part de les interaccions que donen lloc a paràmetres mesurables depenen de l'orientació de la molècula respecte a una direcció externa definida per l'intens camp magnètic extern imprescindible en qualsevol experiment de RMN. Així, un paràmetre com l'apantallament d'un nucli, característic del seu entorn químic i que determina la freqüència del senyal, canvia quan fem girar un cristall de la molècula que el contingui respecte al camp magnètic extern. L'apantallament químic és, doncs, una magnitud tensorial. Les interaccions anisotròpiques, en principi, permeten estudiar l'estructura de la molècula respecte a una direcció externa i, per tant, relacionar l'orientació de parts arbitràriament distants de la molècula.

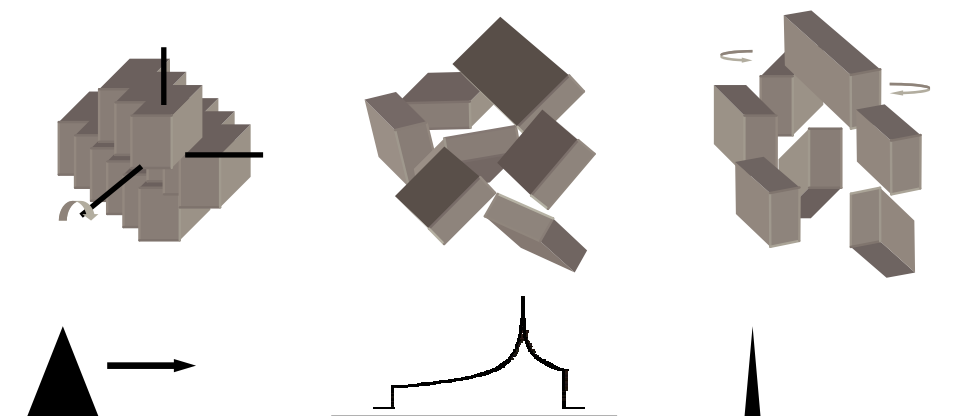


FIGURA 2. Anisotropia d'apantallament. L'apantallament, i per tant el desplaçament químic, depèn de l'orientació de la molècula respecte al camp magnètic extern. En un cristall tots els nuclis en posicions equivalents tenen el mateix desplaçament químic però això canvia quan fem girar el cristall (esquerra). En una mostra policristal·lina, els senyals de nuclis químicament equivalents però diferentment orientats se sobreposen per a donar un senyal de forma característica (centre). En un cristall líquid, la reorientació ràpida dóna lloc a valors mitjans d'apantallament, però com que la reorientació no és igual per a totes les direccions, el senyal resultant encara té una dependència residual de l'orientació (dreta). En una dissolució isotròpica, l'apantallament observat és independent de la reorientació.

Igualment, en el cas de l'acoblament dipolar, si féssim girar el cristall que conté la molècula respecte al camp magnètic, observariem que la separació dels senyals canvia. Els acoblaments dipolars són també magnituds tensorials. En un sistema sòlid però no ordenat, per exemple, una mostra policristal·lina, tindriem una superposició dels senyals i observariem un senyal ample amb una forma característica. En un sistema fluid no observariem la superposició dels doblets sinó la seva mitjana que, en un sistema isotròpic, dóna lloc a la seva cancel·lació, i no observarem cap tipus de desdoblament a causa de les interaccions dipolars. Els desdoblaments que s'observen en els espectres de RMN en dissolució tenen un origen diferent i són independents de l'orientació de la molècula respecte al camp extern. Per això els anomenem *acoblaments escalars*.

Els acoblaments dipolars contenen una important informació estructural però no son observables en molècules en dissolucions isotròpiques. D'altra banda, en els es-

pectres de mostres sòlides estàtiques, els efectes d'un gran nombre d'interaccions i les particulars característiques de relaxació dels sòlids s'ajunten de manera que els espectres de RMN es redueixen a una banda molt ampla. L'aplicació de tècniques especials, com la rotació en l'angle màgic, o determinades seqüències d'impulsos, proporcionen espectres interpretables perquè eliminen, precisament i entre altres coses, els acoblaments dipolars.

Un intent històric de trobar una manera d'explotar el contingut estructural dels acoblaments dipolars fou la utilització de cristalls líquids com a dissolvents en RMN (Emsley i Lindon, 1975). En aquests sistemes la posició de les molècules canvia amb el temps, com en els líquids, però la seva orientació només fluctua dins un marge restringit. Molts cristalls líquids s'orienten en camps magnètics, i molècules dissoltes en aquestes fases esdevenen fortament orientades respecte a aquest camp. Així, els acoblament dipolars no s'anul·len. Malauradament, si ens

centrem en l'observació de l'espectre de RMN de protó, el nombre d'acoblements pot ser molt elevat i la seva magnitud és sovint més gran que la diferència de desplaçaments químics. Això complica seriosament l'anàlisi de qualsevol molècula d'interès, fora de les més senzilles.

L'explosió actual de l'ús dels acoblements dipolars en l'estudi de proteïnes deriva de dos avenços tecnològics significatius: l'ús de molècules marcades isotòpicament obtingudes per expressió en medis enriquits, i la introducció de sistemes orientadors modulables (Tjandra-Bax, 1997). El primer ha permès centrar els estudis en els acoblements dipolars entre nuclis directament enllaçats, per exemple els grups NH o CH de l'esquelet proteic. D'aquesta manera, l'acoblament dipolar entre els nuclis d'interès és el més important i no hem de preocupar-nos dels possibles acoblements amb altres nuclis propers. D'altra banda, la utilització de sistemes que indueixen un grau d'orientació molt petit permet reduir els

acoblements dipolars a una magnitud prou petita perquè no representin una complicació important en l'espectre. L'ús dels acoblements dipolars ha estat revisat recentment (Prestegard *et al.*, 2000; Bax *et al.*, 2001; De Alba i Tjandra, 2002). És important destacar que els acoblements dipolars han demostrat la seva utilitat també en sistemes estesos i amb una gran anisotropia intrínseca, com són els àcids nucleics (Al Hashimi *et al.*, 2001; Trantirek *et al.*, 2000), i per a l'estudi d'interaccions intermoleculares (Olejniczak *et al.*, 1999). Tot i això, aquesta revisió es concentrarà en l'aplicació en el camp de les proteïnes.

## ORIENTACIÓ MAGNÈTICA

L'orientació parcial d'una molècula pot aconseguir-se per interacció amb el mateix camp magnètic, per interacció amb un sistema ja orientat –sigui per efecte del camp magnètic o qualsevol altra raó–, o per inter-

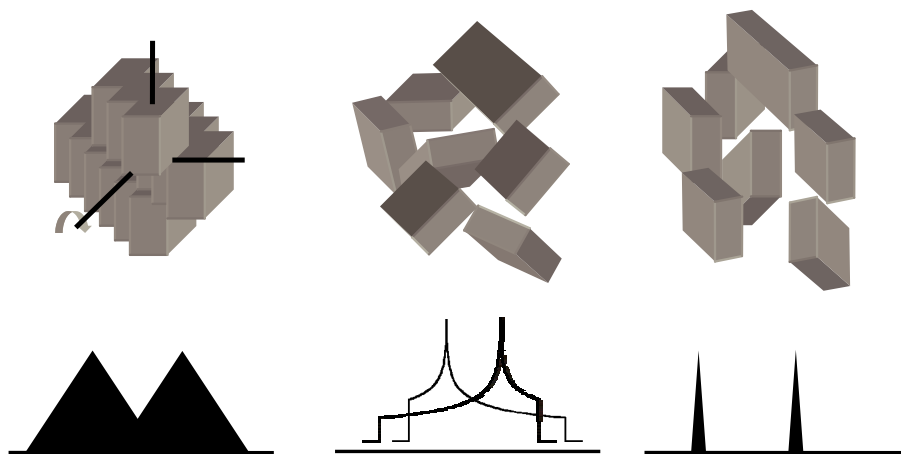


FIGURA 3. Acoblements residuals en sistemes orientats. La separació dels doblets deguts a l'acoblament dipolar en estat sòlid és de milers de Hz i depèn de l'orientació. Els espectres són complexos, ja que hi ha molts nuclis acoblats simultàniament. En una mostra policristalina s'observen els anomenats *doblets de Pake*. En mostres parcialment orientades els acoblements dipolars residuals són molt més petits i només s'observen entre nuclis molt propers (per exemple, els que estan directament enllaçats). Això dona espectres molt més senzills i comparables als que s'obtenen en dissolucions isotròpiques, però amb informació sobre l'orientació relativa dels diferents vectors internuclears.

acció amb algun altre camp de força com, per exemple, un camp elèctric. L'energia d'interacció d'una molècula amb un camp magnètic està regida per una propietat que s'anomena *susceptibilitat magnètica*. La susceptibilitat magnètica determina la capacitat d'un camp magnètic extern per a generar un camp induït que interaccionarà amb el camp extern. Intuïtivament pot associar-se a la circulació d'electrons induïda pel camp extern i és fàcil de veure que segons el tipus d'enllaços i la seva distribució en la molècula la circulació d'electrons serà més fàcil per a certes orientacions de la molècula respecte al camp magnètic extern que no per a altres. La susceptibilitat magnètica també és una magnitud tensorial.

L'energia d'interacció amb el camp magnètic extern és la que resulta entre el camp extern i el camp induït (que és proporcional al mateix camp i a la susceptibilitat magnètica). Així, la diferència d'energia màxima entre dues orientacions és proporcional a l'anisotropia de susceptibilitat magnètica i al quadrat del camp extern.

Imaginem, per exemple, el cas d'una molècula de benzè. La circulació electrònica del sistema  $\pi$  al voltant de l'eix de simetria  $C_6$  és clarament més fàcil que la circulació en una direcció perpendicular. Així, el benzè és una molècula que manifesta una forta anisotropia de susceptibilitat magnètica. Quan una molècula de benzè es col·loca en un camp magnètic intens, l'energia d'interacció amb el camp magnètic de les molècules que estan orientades amb el seu eix de màxima simetria dirigit en la direcció del camp o perpendicular en aquest és diferent, i la forma de menor energia predominarà seguint la típica distribució de Boltzmann.

Per a una molècula de benzè aïllada aquesta diferència és molt petita però en macromolècules formades per molts anells aromàtics orientats de la mateixa manera, per exemple, un fragment de DNA, els efec-

tes són additius, i el grau d'orientació en els camps magnètics intensos utilitzats en RMN passa a ser mesurable. Altres enllaços, com els enllaços peptídics, presenten fortes anisotropies de susceptibilitat magnètica que poden manifestar-se si la seva orientació relativa es manté de forma que els efectes se sumin. Aquest és el cas de les hèlixs  $\alpha$ , en què tots els enllaços amida estan orientats amb el grup carbonil dirigit aproximadament en la direcció de l'eix de l'hèlix.

Els sistemes que contenen electrons desparellats, per exemple, per la presència de cations paramagnètics, presenten també fortes anisotropies de susceptibilitat magnètica que determinen la seva orientació en un camp magnètic. Les primeres mesures d'acoblements dipolars en proteïnes es van fer amb una proteïna paramagnètica (Tolman *et al.*, 1996). La substitució del calci per ions lantànids paramagnètics, de mida semblant a l'ió calci, permet convertir en paramagnètiques aquelles proteïnes que uneixen calci de forma natural, i així orientar-les en un camp magnètic (Contreras *et al.*, 1999). L'orientació magnètica directa del sistema d'interès obre la possibilitat d'estudiar l'orientació selectiva d'un component en una barreja, i també d'estudiar fenòmens d'associació en què un component de baixa anisotropia esdevé orientat per interacció amb una altra molècula que està ben orientada.

## SISTEMES ORIENTADORS

De la mateixa manera que la susceptibilitat dels diferents enllaços d'una molècula s'addiciona si tots estan orientats de la mateixa manera, en sistemes orientats com els cristalls líquids, l'anisotropia de susceptibilitat magnètica global és prou gran per a donar orientacions properes al 100 % a les temperatures i camps magnètics habituals.

Per a evitar els problemes associats a la

extrema complexitat dels espectres de molècules molt orientades, les aplicacions recents a la mesura d'acoblements dipolars s'han fet utilitzant cristalls líquids diluïts.

Molts dissolvents clàssics que formen fases amb característiques de cristall líquid ho fan només a concentracions elevades en què es manifesten les interaccions intermoleculars responsables del seu ordenament. En disminuir la concentració, les interaccions intermoleculars no són suficients per a establir una ordenació de llarg abast i el sistema esdevé isotròpic. D'altra banda, en sistemes de caire micellar o constituïts per microcristalls

discrets, la cooperativitat dins la micella o el microcristall pot ser prou gran per a assegurar l'orientació de cada una de les partícules. En aquests sistemes, la dilució té només un efecte moderat, ja que no afecta l'ordre dins la partícula, tot i que sí disminueix l'ordenament cooperatiu del conjunt de les partícules. Evidentment, la dilució modifica el nombre de partícules orientades per unitat de volum i la separació mitjana entre les partícules i, per tant, l'efecte orientador que puguin exercir sobre una macromolècula present en la dissolució. Així, una característica important dels cristalls líquids diluïts és la possibilitat de determinar a voluntat el grau d'ordre i, per tant, l'escala dels acoblements dipolars que es volen mesurar.

El primer tipus de cristall líquid diluït que es va introduir en l'estudi de biomolècules foren les bicelles (Sanders-Prosser 1998). Les bicelles estan constituïdes fonamentalment per barreges de fosfolípids (p. ex., dimiristoilfosfatidilcolina, DMPC en anglès) i detergents (p. ex., dihexanoilfosfatidilcolina, DHPC). Inicialment les bicelles es van introduir com a models de membrana amb la idea d'utilitzar-les per a alinear proteïnes de membrana per a estudiar-los en fase sòlida amb RMN i s'utilitzaven en altes concentracions. En condicions diluïdes (3-10 % pes/volum) cal treballar en un rang estret de proporcions relatives dels dos components DHPC:DMPC (2,9-3,7) i de temperatura (35-42 °C), fora del qual no s'observa alineament. La transició reversible entre una fase ordenada i una fase isotròpica al voltant dels 25 °C és útil per a poder mesurar en condicions semblants un espectre de referència per a separar les contribucions dels acoblements escalars (presentes a les dues temperatures) i dipolars (només observables per sobre de 35 °C). Les bicelles són estructures discoïdals d'algunes desenes de nanòmetres (20-25 nm) de

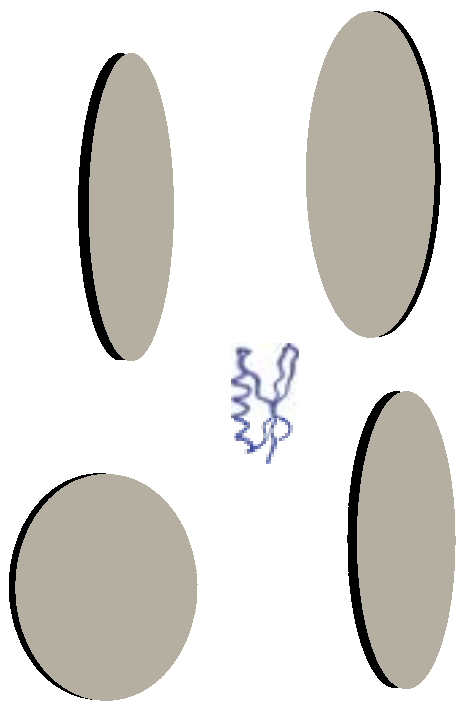


FIGURA 4. Orientació d'una proteïna per mitjà de bicelles. L'anisotropia de la susceptibilitat magnètica de les bicelles fa que estiguin orientades amb la normal del pla de la membrana perpendicular al camp magnètic extern. Una proteïna dissolta en aquest medi experimenta una orientació parcial com a resultat de les restriccions estèriques imposades per les bicelles a les molècules que es troben prop de la seva superfície. En altres sistemes, la interacció entre la proteïna i el sistema orientador pot tenir un fort component electrostàtic.

diàmetre i uns 4 nm de gruix. En un camp magnètic s'orienten amb la normal al pla perpendicular al camp magnètic. En una concentració d'un 5 % la separació entre bicelles supera els 40 nm i, en absència d'interaccions específiques, la difusió rotacional de les proteïnes dissoltes en el medi no es veu afectada i poden obtenir-se espectres de RMN d'alta qualitat.

La utilització de bicelles presenta diversos problemes a causa de la seva limitada tolerància a diferents condicions experimentals i la seva poca estabilitat. S'han descrit modificacions que augmenten la seva estabilitat (p. ex., la substitució dels enllaços èster per èter, o l'addició de detergents carregats), el rang útil de temperatura o la seva orientació respecte al camp.

Els fragments de membrana porpra són un altre sistema orientador que presenta característiques interessants (Koenig *et al.*, 1999; Sass *et al.*, 1999). Es tracta de fragments especialitzats de la membrana d'*Halobacterium salinarium* constituïts en un 70 % per una única proteïna integral de membrana anomenada *bacteriorodopsina*, acompanyada de lípids àcids que confereixen una forta càrrega negativa a la superfície. Els fragments de membrana tenen un diàmetre al voltant de 750 nm i un gruix de 5 nm. La bacteriorodopsina té set hèlixs transmembranals i s'agrupa formant una xarxa cristallina bidimensional amb una mitjana de 40.000 molècules per fragment, que dóna lloc a una gran anisotropia de susceptibilitat magnètica i causa l'alineació completa dels fragments individuals, amb la normal al pla de la membrana dirigida en la direcció del camp magnètic. Recentment s'ha demostrat que és possible canviar l'orientació dels fragments de membrana porpra utilitzant certs lantànids (Bernadó *et al.*, 2002). Els fragments de membrana porpra tendeixen a unir de manera transitòria algunes proteïnes.

Un altre sistema que ha estat extensa-

ment utilitzat és el format per partícules víriques (Hansen *et al.*, 1998). El bacteriòfag Pf1 està format per una molècula de DNA circular monocatenari empaquetat en una càpsida proteica que forma un filament de 6 nm de diàmetre i uns 2.000 nm de longitud que s'orienta amb el seu eix dirigit en la direcció del camp magnètic. El bacteriòfag és estable en diferents condicions experimentals i manté l'ordre en un ampli rang de temperatures i de concentracions. El bacteriòfag Pf1 té càrrega negativa a pH fisiològic i no pot modificar-se. Els espectres de referència s'han d'obtenir a partir d'una segona mostra de la proteïna en la qual no s'ha addicionat el bacteriòfag.

Els microcristalls de cel·lulosa han estat descrits com una possible alternativa (Fleming *et al.*, 2000). Formats per hidròlisi parcial de la cel·lulosa del paper, els microcristalls són estructures cilíndriques (d'uns 200 nm de longitud per 10 nm de diàmetre) que formen una fase nemàtica en concentracions superiors a 4,5 % pes/volum i que és estable en un extens rang de pH i temperatura, però és poc tolerant a la presència de sals. Els microcristalls de cel·lulosa tenen una feble càrrega negativa a causa dels grups sulfat introduïts durant la hidròlisi amb àcid sulfúric, i s'orienten amb l'eix del cilindre paral·lel al camp magnètic extern.

Altres sistemes es basen en la utilització de barreges de tensioactius: clorur o bromur de cetilpiridini/hexanol (Prosser *et al.*, 1998; Barrientos *et al.*, 2000), n-alquilpoli (etilen glicol)/n-alquil alcohols (Rückert i Otting, 2000), glucopone (una barreja de sucres alquilats)/hexanol (Stradner *et al.*, 1999) i és previsible que aquesta llista continuï augmentant.

La possibilitat d'induir l'orientació utilitzant sistemes alternatius al camp magnètic ha estat igualment explorada. S'han utilitzat camps elèctrics, continus o alterns, per a induir l'orientació (Plantenga *et al.*, 1982;



Peshkovsky i McDermott, 2000; Riley i Augustine, 2000), tot i que la necessitat d'utilitzar instruments modificats necessàriament en restringeixen l'aplicació. El seu principal avantatge potencial és la possibilitat de canviar ràpidament de la forma orientada a la forma isotròpica, i així poder establir correlacions entre les dues formes.

Molt recentment s'ha demostrat l'orientació mecànica de proteïnes per compressió anisotròpica de gels de poliacrilamida (Tycko *et al.*, 2000). Aquest sistema és estable en la majoria de les condicions experimentals d'interès biològic, no està carregat i no s'uneix a proteïnes i permet obtenir espectres d'alta resolució. És possible utilitzar diverses formes de compressió o expansió, i en aquest moment, sembla un dels sistemes més prometedors, atès el seu caràcter universal.

## MESURA DELS ACOBLAMENTS DIPOLARS

La mesura del valor de la constant d'acoblament dipolar residual ( $D_{AB}$ ) en un medi orientat utilitza els mateixos tipus d'experiments que es poden fer servir per a la mesura acurada de les constants d'acoblament escalars ( $J_{AB}$ ). De fet, en molts casos, i certament quan els nuclis implicats estan directament units, la mesura dels acoblaments dipolars es fa per diferència entre els valors obtinguts en un medi orientat, que proporcionen  $J_{AB} + D_{AB}$  i en un medi isotròpic on únicament es mesura  $J_{AB}$ .

El mètode més senzill per a mesurar els acoblaments és l'eliminació del pols de  $180^\circ$  que habitualment s'utilitza en els experiments de HSQC per a suprimir els acoblaments. Així, a la dimensió indirecta —aquella en què es mesura el desplaçament de l'heteroàtom— els senyals apareixen desdoblats i pot mesurar-se'n la separació. En el

cas dels acoblaments petits és possible augmentar-ne la separació incloent a la seqüència un temps addicional en què només evoluciona l'acoblament (Tolman i Prestegard, 1996).

En el cas de constants d'acoblament grans i espectres complicats, la complexitat addicional deguda al fet que el nombre de senyals es duplica per causa dels acoblaments pot dificultar-ne l'anàlisi. En aquests casos la utilització de mètodes que permeten l'observació separada dels senyals de camp alt i camp baix proporciona dos espectres amb els mateixos senyals però separats pel valor de les constants d'acoblament. El més utilitzat d'aquests mètodes és l'anomenat *IPAP* (Ottiger *et al.*, 1998).

Quan les constants per mesurar són molt petites, comparables o més petites que l'amplada de banda, la mesura dels acoblaments es pot fer utilitzant mètodes basats en els experiments E-COSY (Wang *et al.*, 1998), o a partir de mesures de la intensitat d'un senyal modulat per l'evolució de l'acoblament d'interès durant un interval de temps variable (Tjandra i Bax, 1997). Aquest mètode permeten mesurar acoblaments amb precisions de 0,1-0,2 Hz.

## UTILITZACIÓ D'ACOBLAMENTS DIPOLARS EN EL CÀLCUL D'ESTRUCTURES

Els acoblaments dipolars proporcionen informació sobre l'orientació de diferents vectors internuclears respecte d'un sistema de referència comú. Aquesta informació angular s'obté amb una precisió elevada i és independent de la separació entre els diferents vectors. La utilització d'aquesta informació per a la determinació d'estructures està subjecte a algunes limitacions: en primer lloc, els paràmetres que defineixen l'orientació global de tota l'estructura no es co-

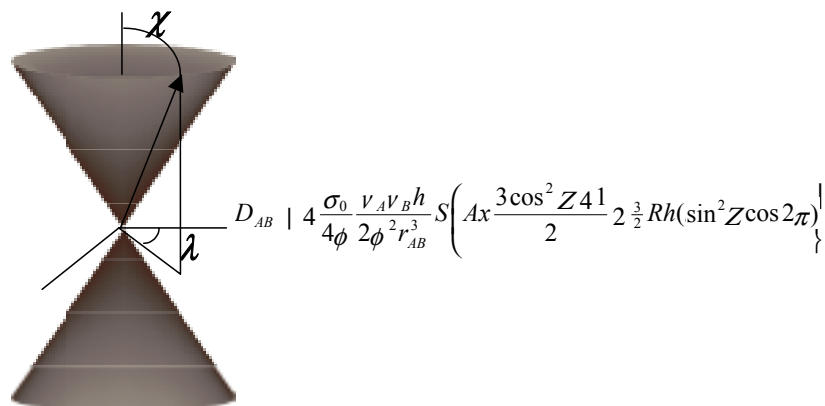


FIGURA 5. Degeneració de les solucions. Un mateix valor de la constant d'acoblament  $D_{AB}$  és compatible amb infinites orientacions si el sistema té simetria axial. Les solucions possibles estan representades per la superfície dels dos conus que formen un angle en la direcció del camp. La distorsió respecte a la simetria axial està representada pel terme ròmbic ( $Rh$ ). Si aquest terme és important cal tenir en compte també l'angle  $\theta$ .

neixen *a priori* i cal trobar-los. En segon lloc, no hi ha una correspondència directa entre les constants dipolars residuals i els angles polars que defineixen l'orientació, sinó que per a cada valor de la constant dipolar residual existeix un nombre infinit de solucions, que defineixen la superfície de dos conus.

Els components axial i ròmbic del tensor d'alineament es poden obtenir sense coneixement previ de l'estructura a partir de la distribució dels valors de les constants d'acoblament sempre que el nombre de mesures sigui prou gran i els vectors corresponents estiguin distribuïts uniformement en totes les orientacions possibles (Clare *et al.*, 1998). D'altra banda, l'orientació dels tensor d'alineament respecte a la molècula està definida per tres paràmetres angulars que s'ajusten per a obtenir el millor acord entre els valors experimentals i el model.

La solució al problema de la degeneració passa per la determinació de diferents conjunts independents d'acoblaments dipolars, generalment obtinguts a partir de diferents sistemes orientadors. La utilització de dos

sistemes independents redueix la degeneració en les direccions dels vectors a vuit punts (Ramírez i Bax, 1998). Si es mesuren simultàniament diversos vectors amb una orientació relativa coneguda (p. ex., perquè formen part d'un enllaç amida o una altra estructura plana) existeixen vuit solucions quan s'utilitza un sol sistema orientador, que es redueixen a quatre utilitzant dos sistemes d'alineament. Finalment, si es mesuren un mínim de cinc acoblaments en un fragment tridimensional conegut, hi ha quatre solucions si s'utilitza un sol sistema orientador, i la degeneració desapareix si s'usen dos sistemes orientadors independents. Recentment, l'estructura de la proteïna *ubiquitina* ha estat determinada utilitzant només acoblaments dipolars obtinguts en dos sistemes orientadors diferents (Hus *et al.*, 2001).

La incorporació d'acoblaments dipolars residuals millora la precisió de les estructures determinades per ressonància magnètica nuclear i, en general, també la seva semblança amb les estructures de les obtingudes per difracció de raigs X, almenys en el cas de les estructures globulars compactes.

Per posar un exemple, la diferència quadràtica mitjana entre els àtoms de l'esquelet del conjunt d'estructures per al domini B1 de la proteïna G en afegir acoblaments dipolars va disminuir de 2,88 Å a 1,37 Å i la diferència amb l'estructura de raigs X va passar de 4,33 Å a 1,12 Å (Clare *et al.*, 1999a).

Els acoblaments dipolars s'han utilitzat per a definir un factor R, anàleg al que s'utilitza habitualment en cristal·lografia, que compara la diferència entre els valors observats i calculats i la que s'esperaria si els vectors estiguessin distribuïts a l'atzar (Clare i Garrett, 1999b).

El camp on els acoblaments dipolars residuais tenen una aplicació més evident és en el de les proteïnes multidomini. En aquests casos la determinació de l'orientació relativa dels dominis sovint és problemàtica, atesa la baixa densitat de l'NOe a la interfase entre dominis, però la inclusió d'acoblaments dipolars proporciona, precisament, la informació angular per a desfer les ambigüitats. És interessant constatar que els problemes de distorsió de l'estructura a causa de l'empaquetament cristallí poden ser importants precisament en el cas de proteïnes multidomini, i cal esperar, com sembla que succeeix, que el nombre de casos en què les estructures de raigs X i de RMN no són idèntiques augmentarà a mesura que s'estudiïn més exemples de proteïnes multidomini.

#### UTILITZACIÓ DELS ACOBLAMENTS DIPOLARS EN GENÒMICA ESTRUCTURAL

Un dels avantatges dels acoblaments dipolars com a font d'informació estructural és la facilitat amb què poden mesurar-se i assignar-se, i això ha disparat l'interès d'utilitzar-los en el camp de la genòmica estructural (Prestegard *et al.*, 2001). Els acobla-

ments dipolars residuais poden utilitzar-se per a la cerca qualitativa en el Protein Data Bank (PDB) de tipus de plegaments semblants (Annala *et al.*, 1999) o per a la comparació quantitativa amb proteïnes completes (Meiler *et al.*, 2000).

El grup de Bax ha proposat un esquema de reemplaçament de fragments moleculars, basat en la cerca en el PDB de fragments de set residus que donen una bona concordança amb els valors dels acoblaments dipolars observats per a un segment de la mateixa longitud. Les semblances amb els mètodes utilitzats en cristal·lografia per al traçat automàtic de la cadena peptídica a partir dels mapes de densitat electrònica és reveladora (Delaglio *et al.*, 2000). Recentment s'ha proposat un altre mètode que permet identificar motius de plegament local utilitzant acoblaments dipolars residuais (Andrec *et al.*, 2001).

#### LES CONSTANTS D'ACOBAMENT DIPOLARS EN ESTRUCTURES FLEXIBLES

Les macromolècules no són estructures rígides, sinó que experimenten fluctuacions en diferents escales de temps. Típicament, els aspectes dinàmics s'estudien per mitjà de mesures de temps de relaxació que s'analitzen per a obtenir els paràmetres d'ordre que indiquen l'amplitud de les fluctuacions en una escala de temps més ràpida que el moviment global de la molècula (ps-ns). Els acoblaments dipolars estan afectats per la mobilitat interna en una escala de temps que arriba fins als mil·lisegons i, per tant, poden proporcionar una informació dinàmica molt valuosa.

Cal distingir dues situacions. En el primer cas els moviments són locals i no afecten significativament la forma global de la molècula, i resulta raonable esperar que no

en condicionin el grau d'alineament. En el segon cas, els moviments són de gran amplitud i àmpliament cooperatius p. ex., la reorientació de dominis. En aquest cas no és evident que la mobilitat no estigui afectada per la interacció amb el medi orientador, o que l'orientació global no sigui una mitjana de les orientacions induïdes en les diferents formes que s'estan interconvertint.

El primer cas ha estat estudiat independentment pels grups de Kay i Prestegard, d'una banda (Tolman *et al.*, 2001), i de Griesinger i Brüschweiler, de l'altra (Meiler *et al.*, 2001). Els primers autors conclouen que les fluctuacions de baixa amplitud ( $< 10^\circ$ ) tenen poc efecte en la qualitat de les estructures obtingudes i presenten criteris per a distingir aquells residus que poden estar afectats per fluctuacions. Els segons analitzen l'efecte de la mobilitat sobre un factor de qualitat de les estructures segons el tipus de tractament de dades que s'utilitzi. A més, proposen que l'estudi de diferents sistemes d'alineament pot proporcionar informació sobre la mobilitat.

L'estudi dels moviments de gran amplitud pot abordar-se a partir del coneixement de les estructures dels dominis individuals, ajustant els valors experimentals dels acoblaments dipolars a l'estructura per a extreure'n el tensor d'orientació corresponent. Si l'estructura global és rígida, els dos tensors han de ser iguals, però això no passarà si la unió entre els dominis és flexible. Fins i tot sense conèixer les estructures dels dominis, els valors que caracteritzen el tensor d'orientació poden extreure's de la distribució dels valors de les constants d'acoblament dipolar. La comparació entre les distribucions en els diferents dominis és, doncs, suficient per a detectar la rigidesa o la flexibilitat de la unió (Braddock *et al.*, 2001).

## BIBLIOGRAFIA

- AL-HASHIMI, H. M.; J. R. TOLMAN; A. MAJUMDAR; G. A. ORIN; D. J. PATEL (2001). «Determining the stoichiometry in homomultimeric nucleic acid complexes using magnetic field induced residual dipolar couplings». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 123, pàg. 5806-5807.
- ANNILA, A.; H. AITIO; E. THULIN; T. DRAKENBERG (1999). «Recognition of protein folds via dipolar couplings». *J. Biomol. NMR*, núm. 14, pàg. 223-230.
- ANDREC, M.; P. DU; R. M. LEVY (2001). «Protein structural motif recognition via NMR residual dipolar couplings». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 123, pàg. 1222-1229.
- BARRIENTOS, L. G.; C. DOLAN; A. M. GRONENBORN (2000). «Characterization of surfactant liquid crystal phases suitable for molecular alignment and measurement of dipolar couplings». *J. Biomol. NMR*, núm. 16, pàg. 329-337.
- BAX, A.; G. KONTAXIS; N. TJANDRA (2001). «Dipolar Couplings in macromolecular structure determination». *Meth. Enzymol.*, núm. 339, pàg. 127-174.
- BERNADÓ, P.; R. BARBIERI; E. PADRÓS; C. LUCHINAT; M. PONS (2002). «Lanthanide modulation of the orientation of macromolecules induced by purple membrane». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 124, pàg. 374-375.
- BRADDOCK, D. T.; M. CAI; J. L. BABER; Y. HUANG; G. M. CLORE (2001). «Rapid identification of medium to large scale interdomain motion in modular proteins using dipolar couplings». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 123, pàg. 8634-8635.
- CLORE, M.; A. M. GRONENBORN; N. TJANDRA (1998). «Direct structure refinement against residual dipolar couplings in the presence of rhombicity of unknown magnitude». *J. Magn. Reson.*, núm. 131, pàg. 159-162.
- CLORE, G. M.; M. R. STARICH; C. A. BEWLEY; M. L. CAI; J. KUSZEWSKI (1999a). «Impact of residual dipolar couplings on the accuracy of NMR structures determined from a minimal number of NOE restraints». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 121, pàg. 6513-6514.
- CLORE, G. M.; D. S. GARRETT (1999b). «R-factor, free R, and complete cross-validation for dipolar coupling refinement of NMR structures». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 121, pàg. 9008-9012.
- CONTRERAS, M. A.; J. UBACH; O. MILLET; J. RIZO; M. PONS (1999). «Measurement of one bond dipolar couplings through lanthanide-induced orientation of a calcium binding protein». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 121, pàg. 8947-8948.
- DE ALBA, E.; N. TJANDRA (2002). «NMR dipolar couplings for the structure determination of biopolymers in solution». *Progress in NMR Spectroscopy*, núm. 40, pàg. 175-197.
- DELAGLIO, F.; G. KONTAXIS; A. BAX (2000). «Protein struc-

- ture determination using molecular fragment replacement and NMR dipolar couplings». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 122, pàg. 2142-2143.
- FLEMING, K.; D. GRAY; S. PRASANNAN; S. MATTHEWS (2000). «Cellulose crystallites: a new and robust liqueid crystalline medium for the measurement of residual dipolar couplings». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 122, pàg. 5224-5225.
- HANSEN, M. R.; L. MUELLER; A. PARDI (1998). «Tunable alignment of macromolecules by filamentous phage yields dipolar coupling interactions». *Nat. Struct. Biol.*, núm. 5, pàg. 1065-1074.
- HUS, J.-C.; D. MARION; M. BLACKLEDGE (2001). «Determination of protein backbone structure using only residual dipolar couplings». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 123, pàg. 1541-1542.
- KOENIG, B. W.; J. S. HU; M. OTTIGER; S. BOSE; R. W. HENDLER; A. BAX (1999). «NMR measurement of dipolar couplings in proteins aligned by transient binding to purple membrane fragments». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 121, pàg. 1385-1386.
- MEILER, J.; W. PETI; C. GRIESINGER (2000). «DipoCoup: a versatile program for 3D-structure homology comparison based on residual dipolar couplings and pseudocontact shifts». *J. Biomol. NMR*, núm. 17, pàg. 283-294.
- MEILER, J.; J. J. PROMPERS; W. PETI; C. GRIESINGER; R. BRÜSCHWEILER (2001). «Model-free approach to the dynamic interpretation of residual dipolar couplings in globular proteins». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 123, pàg. 6098-6107.
- OLEJNICZAK, E. T.; R. P. MEADOWS; H. WANG; K. L. CAI; D. G. NETTESHEIM; S. W. FESIK (1999). «Improved NMR Structures of Protein/Ligand Complexes Using Residual Dipolar Couplings». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 121, pàg. 9249-9250.
- OTTIGER, M.; F. DELAGLIO; A. BAX (1998). «Measurement of J and dipolar couplings from simplified two-dimensional NMR spectra». *J. Magn. Reson.*, núm. 131, pàg. 373-378.
- PESHKOVSKY, A.; A. E. MCDERMOTT (2000). «Dipolar interactions in molecules aligned by strong AC electric fields». *J. Magn. Reson.*, núm. 147, pàg. 104-109.
- PLANTENGA, T. M.; P. C. M. VANZIJL; C. MACLEAN (1982). «Studies of quadrupolar and dipolar electric field effects in the NMR spectra of binary mixtures of liquids». *Chem. Phys.*, núm. 66, pàg. 1-9.
- PRESTEGARD, J. H.; H. M. AL-HASHIMI; J. R. TOLMAN (2000). «NMR Structures of biomolecules using field oriented media and residual dipolar couplings». *Q. Rev. Biophys.*, núm. 33, pàg. 371-424.
- PRESTEGARD, J. H.; H. VALAFAR; J. GLUSHKA; F. TIAN (2001). «Nuclear magnetic resonance in the era of structural genomics». *Biochemistry*, núm. 40, pàg. 8677-8685.
- PROSSER, R. S.; J. A. LOSONCZI; I. V. SHIVANVSKAYA (1998). «Use of novel aqueous liquid crystalline medium for high-resolution NMR of macromolecules in solution». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 120, pàg. 111010-111011.
- RAMIREZ, B. E.; A. BAX (1998). «Modulation of the alignment tensor of macromolecules dissolved in a dilute liquid crystalline medium». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 120, pàg. 9106-9107.
- RILEY, S. A.; M. P. AUGUSTINE (2000). «Extracting residual NMR coupling constants from electrically aligned liquids». *J. Phys. Chem. A*, núm. 104, pàg. 3326-3331.
- RÜCKERT, M.; G. OTTING (2000). «Alignment of biological macromolecules in novel nonionic liquid crystalline media». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 122, pàg. 7793-7797.
- SANDERS, C. R.; R. S. PROSSER (1998). «Bicelles: a model membrane system for all seasons?». *Struct. Fold. Des.*, núm. 6, pàg. 1227-1234.
- SASS, J.; F. CORDIER; A. HOFFMANN; M. ROGOWSKI; A. COUSIN; J. G. OMICHINSKI; H. LÖWEN; S. GRZESIEK (1999). «Purple membrane induced alignment of biological macromolecules in the magnetic field». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 121, pàg. 2047-2055.
- STRADNER, A.; B. MAYER; T. SÖTTMAN; A. HERMETTER; O. GLATTER (1999). «Sugar surfactant-based solutions as hosts systems for enzyme activity measurements». *J. Phys. Chem. B*, núm. 103, pàg. 6680-6689.
- TJANDRA, N.; A. BAX (1997). «Measurement of dipolar contributions to  $(1)J(\text{CH})$  splittings from magnetic field dependence of J modulation in two dimensional NMR spectra». *J. Magn. Reson.*, núm. 124, pàg. 512-515.
- TOLMAN, J. R.; J. H. PRESTEGARD (1996). «Measurement of amide N-15-H-1 one bond couplings in proteins using accordion heteronuclear-shift-correlation experiments». *J. Magn. Reson. Ser. B.*, núm. 112, pàg. 269-274.
- TOLMAN, J. R.; H. M. AL-HASHIMI; L. E. KAY; J. H. PRESTEGARD (2001). «Structural and dynamic analysis of residual dipolar coupling data for proteins». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 123, pàg. 1416-1424.
- TRANTIREK, L.; M. URBASEK; R. STEFL; J. FEIGON; V. SKLENAR (2000). «A method for direct determination of helical parameters in nucleic acids using residual dipolar couplings». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 122, pàg. 10454-10455.
- TYCKO, R.; F. J. BLANCO; Y. ISHII (2000). «Alignment of biopolymers in strained gels: a new way to create detectable dipole-dipole couplings in high resolution biomolecular NMR». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 122, pàg. 9340-9341.
- WANG, H.; J. L. MARQUARDT; P. WINGFIELD; S. J. STAHL; S. LEE-HUANG; D. TORCHIA; A. BAX (1998). «Simultaneous measurement of  $1\text{H}-15\text{N}$ ,  $1\text{H}-13\text{C}'$ , and  $15\text{N}-13\text{C}'$  dipolar couplings in a perdeuterated 30kDa protein dissolved in a dilute liquid crystalline phase». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 120, pàg. 7385-7386.