

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA

APLICACIÓN DE LA RESONANCIA MAGNÉTICA  
NUCLEAR DE SISTEMAS PARAMAGNÉTICOS A LA  
DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y  
DINÁMICAS DE LAS PROTEÍNAS RUSTICIANINA Y  
CALBINDINA D<sub>9K</sub>

BEATRIZ JIMÉNEZ GARRIDO

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2003

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 22 de Setembre de 2003 davant un tribunal format per:

- D. Manuel Rico Sarompas
- D. Jesús Salgado Benito
- D. Joaquín Borrás Tortonda
- D. Jesús Jiménez Barbero
- D. Mario Piccioli

Va ser dirigida per:

D. Antonio Donaire González

D. José María Moratal Mascarell

©Copyright: Servei de Publicacions  
Beatriz Jiménez Garrido

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5822-8

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA

**Aplicación de la Resonancia Magnética Nuclear  
de Sistemas Paramagnéticos a la  
Determinación de las Propiedades  
Estructurales y Dinámicas de las Proteínas  
Rusticianina y Calbindina D<sub>9k</sub>**

**Tesis Doctoral  
Beatriz Jiménez Garrido**

Valencia, 2003



ANTONIO DONAIRE GONZÁLEZ, Investigador "Ramón y Cajal" de la Universidad Miguel Hernández de Elche y JOSÉ MARÍA MORATAL MASCARELL, Catedrático de la Universitat de València, CERTIFICAN:

Que Dña. Beatriz Jiménez Garrido, Licenciada en Química, ha realizado, bajo nuestra dirección, en el Departamento de Química Inorgánica de la Universitat de València, el trabajo que se resume en la presente memoria y por el que desea optar al grado de Doctora (dentro del programa de Doctorado Europeo), y que tiene por título: "*Aplicación de la Resonancia Magnética Nuclear de Sistemas Paramagnéticos a la Determinación de Propiedades Estructurales y Dinámicas de las Proteínas Rusticianina y Calbindina D<sub>9k</sub>*".

Y para que así conste, firmamos este certificado, en Valencia a veinticuatro de Junio de dos mil tres.

Antonio Donaire González

José María Moratal Mascarell

**A mis Padres y a mi Hermana**

## Agradecimientos

Escribir una Tesis Doctoral no es una tarea fácil. Ahora que parece que está llegando el final de ésta no puedo dejar de agradecer a todo el que, con su ayuda, ha hecho posible que llegue hasta aquí:

A Antonio porque él es, en gran medida, el responsable de todo lo que me ha pasado estos años, que aunque duros, han sido muy bonitos. Por haberme dirigido, enseñado, aconsejado, por haberme introducido en el mundo de la ciencia. Me ha encantado trabajar contigo.

A Pepe por el apoyo logístico proporcionado a las necesidades de la investigación.

A la Generalitat Valenciana por haberme concedido la beca que me ha subvencionado durante los dos últimos años.

A la gente del Departamento de Química Inorgánica de la Universitat de València donde he trabajado. Al SCIE y las técnicas de RMN, por su ayuda con el espectrómetro.

A la Fundación CEU San Pablo y la Universidad Cardenal Herrera-CEU por la beca que disfruté los dos primeros años de doctorado. A todo el Departamento de Química de Farmacia donde encontré magníficos compañeros.

A Pepe, a Mónica y a Bárbara por hace más agradables los ratos de comedor. A Isa por todas las charlas de despacho que tanto me han ayudado mucho este curso. A Marta por los viajes en tren. A Elisa por el apoyo moral cuando ella también se dedicaba a escribir. A Nadia por no cortar ese lazo que siempre nos ha unido. A Diego por su ayuda en temas de informática en los momentos de desesperación.

A mis amigos, por confiar siempre en mí. A Alberto y a Jesús M., por las visitas sorpresa y el ánimo en los momentos de bajón. A Jose "Gandía" y a "Jesulín" por no haber roto el contacto. A Jesús R. por el riesgo.

A mis amigas porque siempre me han apoyado y ayudado en todo lo que he hecho. Porque son maravillosas y me llenan de orgullo. A Ana por su racionalidad que consigue llevarnos a reflexiones siempre edificantes. A Carolina por habernos abierto su corazón aunque no lo haga fácilmente. A Eva porque me comprende sin necesidad de explicaciones. A Inma por ser un ejemplo de tesón y saber hacer; porque últimamente todo son buenas noticias. A Lidia por estar siempre pendiente de todo y de todos; porque si hay alguien detallista, ésa es ella.

A todo aquel que sienta que, de alguna manera a contribuido a la realización de este trabajo, la lista sería tan larga que estoy segura que, inconscientemente, olvidaré a alguien.

Ringrazio il Professore Bertini per avermi accolto due volte nel suo gruppo e tutte le persone del CERM per essere state sempre molto gentili con me e avermi fatto sentire bene.

A Mario perché è il capo che tutti vorrebbero avere. Riesce a insegnarti facendoti credere che invece è lui quello che sta imparando.

A Luisa, perché se trovare una persona brava con cui lavorare è difficilissimo, farlo con qualcuno che poi è anche tuo amico è praticamente impossibile. Io ho avuto la fortuna di trovare entrambe le cose in te.

A Gabriele per la amicizia e per tante altre cose che sulla carta non entrano. A Mariapina, perché è impossibile conoscerla e non ringraziarla. A Michael per scegliere così bene gli amici. A Renato per i consigli, ed i sorrisi. A Cristina per avere una stanza pronta per me. A Ilaria perché ha sempre un piano in testa. A Marco per la dose di "Signorile" realtà che sempre ci regala. A Nicola per essere sempre pronto a sorridere.

I would like to thank Dr. Hall for his kindness when I went to England.

A mi familia, por interesarse por lo que hago y valorar mi trabajo.

A mi Abue porque siempre se preocupa de nosotros. A mi Tía Sonsoles, por escuchar todas mis historias. A mis primos, Solines, Carlos, Toño, y Ruffi porque son encantadores. A Nacho por sus preguntas de química, por su entusiasmo y atención.

A Papá, por todos los esfuerzos que hace por entrar en nuestro mundo. A Mamá, por habernos dedicado su vida, e intentar que la nuestra sea cada día más bonita. A Noemí, por ser mi amiga además de mi hermana.

A Stefano per credere in me, per tentare di capirmi, per trovare la parola giusta, per essere sempre accanto a me anche a 1430 Km. Per la pazienza, il supporto e l'aiuto negli ultimi giorni. Ma soprattutto per aver fatto crollare i muri.

## Abreviaturas y Acrónimos

<b>FID</b>	Free Induction Decay
<b>NOE</b>	Nuclear Overhauser Effect
<b>NOESY</b>	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
<b>ROESY</b>	Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy
<b>EXSY</b>	EXchange Spectroscopy
<b>COSY</b>	COrrrelation Spectroscopy
<b>ECOSY</b>	Experimento COSY en el que sólo se seleccionan dos de las coherencias observables (de las cuatro posibles) en un experimento bidimensional con un acoplamiento escalar. Además no se eliminan los acoplamientos ni en la evolución ni en la adquisición por lo que en estos experimentos es fácil medir la constante de acoplamiento buscada.
<b>TOCSY</b>	TOtal Correlation Spectroscopy
<b>INEPT</b>	Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer
<b>HMOC</b>	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
<b>HSQC</b>	Heteronuclear Single Quantum Correlation
<b>TROSY</b>	Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy
<b>CRINEPT</b>	Cross Relaxation-Enhanced Polarization Transfer
<b>cleanex</b>	acrónimo de (CLEANEX-PM)-FHSQC ( <i>Phase-Modulated CLEAN chemical EXchange spectroscopy with Fast-HSQC</i> )
<b>WEFT</b>	Water-Eliminated Fourier Transformation
<b>pcs</b>	desplazamiento de pseudocontacto (del inglés <i>pseudocontact shift</i> )
<b>rdc</b>	acoplamiento dipolar residual (del inglés <i>residual dipolar coupling</i> )
<b>ccr</b>	velocidad de correlación de cruce (del inglés <i>cross correlation rate</i> )
<b>csa</b>	anisotropía del desplazamiento químico (del inglés <i>chemical shift anisotropy</i> )
<b>DIANA</b>	Distance geometry Algorithm for Nmr Applications
<b>DYANA</b>	DYnamics Algorithm for Nmr Applications
<b>CYANA</b>	Combined assignment and dYnamics Algorithm for NMR Applications
<b>CSI</b>	Chemical Shift Index
<b>ESE</b>	Electron Self-Exchange
<b>HOMO</b>	Highest Occupied Molecular Orbital
<b>PDB</b>	Protein Data Bank



<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>EPR</b>	Electron Paramagnetic Resonance
<b>MRI</b>	Magnetic Resonance Imaging
<b>RR</b>	Raman Resonance
<b>ENDOR</b>	Electron Nuclear DOuble Resonance
<b>ESEEM</b>	Electron Spin Echo Envelope Modulation
<b>LMCT</b>	Ligand-Metal Charge Transfer
<b>ZFS</b>	Zero-Field Splitting
<b>BUSI</b>	BUII Seminal plasma Inhibitor
<b>HiPIP</b>	High Potential Iron-sulfur Protein
<b>BCP</b>	Blue Copper Protein
<b>Rc</b>	Rusticianina
<b>Pc</b>	Plastocianina
<b>Az</b>	Azurina
<b>Am</b>	Amicianina
<b>PsAz</b>	Pseudoazurina
<b>St</b>	Estelacianina
<b>CBP</b>	Plantacianina o proteína básica de pepino (del inglés <i>Cucumber Basic Protein</i> )
<b>NiR</b>	Nitrito Reductasa
<b>Ctr</b>	Copper transporter
<b>Atx1</b>	Anti-oxidant 1
<b>ccs</b>	copper chaperon for superoxide dismutase
<b>Cm</b>	Calmodulina
<b>Cb</b>	Calbindina
<b>HisN</b>	En Proteínas Azules de Cobre, de los dos ligandos histidina, aquél más próximo en la secuencia primaria al extremo N-terminal.
<b>HisC</b>	En Proteínas Azules de Cobre, de los dos ligandos histidina, aquél más próximo en la secuencia primaria al extremo C-terminal.
<b>DOTA</b>	ácido 1,4,7,10-tetraazacicloDodecano-1,4,7,10-TetraAcético
<b>IPTG</b>	IsoPropil-β-ThioGalactopiranóxido

## Anglicismos

- lock** señal para evitar la deriva y mantener constante el campo magnético de un espectrómetro durante la medida. Normalmente se utiliza la señal de deuterio con este fin.
- line broadening** ensanchamiento de línea.
- spin lock** campo de baja intensidad, generado por la aplicación de un tren de radiofrecuencias, normalmente al campo principal del espectrómetro. Durante este tiempo de *spin lock* se desarrollan acoplamientos (generalmente escalares) en muy diversas secuencias de pulsos.
- flip-back** Esquema de pulso que, basándose en gradientes y en pulsos de fases compensadas, eliminan la señal del disolvente.
- off resonance** Se produce cuando el pulso aplicado no se encuentra exactamente sobre la señal de resonancia. En esas ocasiones se dice que el pulso está *off resonance*. En los experimentos 1D NOE de paramagnéticos, donde se aplican altas potencias de saturación para eliminar la señal irradiada, los efectos denominados de *off resonance* se refieren a aquellos NOEs observados que no provienen de la señal que se está irradiando propiamente, sino de alguna señal cercana (en cuanto a su desplazamiento químico). Esto es debido a que, al saturar la señal de interés, también se satura esa otra señal.
- simulated annealing** Hace referencia a un proceso de cálculo mediante el cuál una secuencia de aminoácidos en estructura al azar y a muy alta temperatura, se pliega en sucesivos pasos hacia un mínimo local de energía cuando se disminuye la temperatura. Este cálculo precede a la minimización estructural (mediante geometría de distancias) en el programa DYANA.
- patch hidrofóbico** Región de una proteína (en nuestro caso, rusticianina) rica en residuos apolares y, por lo tanto, que se excluye del disolvente. En proteínas de transferencia electrónica, estas regiones están implicadas en el reconocimiento intermolecular con compañeros de la cadena y en la misma transferencia electrónica.
- watergate** Secuencia muy eficiente para la eliminación del agua basada en la combinación de pulsos, tiempos y gradientes.
- inversion-recovery** Inversión-recuperación. Secuencia de pulsos para la determinación de la velocidad de relajación longitudinal de un núcleo. Antepuesta a un HSQC (*inversión-recovery* HSQC) permite la determinación de la velocidad de relajación longitudinal de protones unidos a núcleos de carbono-13 o nitrógeno-15.
- echo-antiecho** Secuencia de pulsos que permite una determinada selección de coherencias.

<b>steady-state 1D NOE</b>	NOE 1D en estado estacionario.
<b>superweft</b>	Secuencia de pulsos diseñada para la detección de señales con tiempos de relajación muy cortos.
<b>invsuperweft</b>	Superweft precedido de un pulso de $180^\circ$ y un pequeño tiempo de relajación.
<b>model-free</b>	Modelo teórico ideado por Lipari y Szabo en 1982 por el que se asume cierta función de correlación para los núcleos de un sistema. A partir de este modelo se obtiene el parámetro de orden generalizado, $S^2$ . Este parámetro indica el tipo de movimiento de un núcleo determinado. Un $S^2=0$ implica un movimiento completamente isotrópico (máximo desorden), mientras que un valor $S^2=1$ implica un movimiento completamente anisotrópico (máximo orden o movimiento completamente restringido).

# Índice

	PÁGINA
<b>I. Introducción</b>	1
1. RMN en Sistemas Biológicos: Breve Introducción Histórica	3
1.1. Nacimiento y Orígenes de la RMN	3
1.2. RMN en Proteínas	5
1.3. RMN e Iones Paramagnéticos	8
2. RMN en Sistemas Paramagnéticos	16
2.1. Interacción Núcleo-Electrón	16
2.2. Acoplamiento Hiperfino	17
2.3. Desplazamiento Hiperfino	18
a) Desplazamiento de contacto	18
b) Anisotropía magnética y desplazamiento dipolar	19
2.4. Velocidades de Relajación	22
a) Relajación de contacto	23
b) Relajación dipolar	24
c) Relajación de Curie	25
2.5. Iones Metálicos Adecuados para su Estudio mediante RMN	25
a) Iones de la serie <i>d</i>	27
b) Iones de la serie <i>f</i>	30
2.6. Experimentos Básicos en la RMN de Sistemas Paramagnéticos	32
a) Secuencia <i>superweft</i>	33

b) Experimento NOE	33
c) Espectroscopía de intercambio	34
3. Proteínas Azules de Cobre: Rusticianina	35
3.1. El Cobre en Sistemas Biológicos	35
3.2. Proteínas Azules de Cobre	38
a) Características generales	38
b) Estructura tridimensional	40
c) Estructura del centro activo	40
d) Características espectroscópicas	43
e) Potenciales redox	45
f) Mecanismos de transferencia electrónica	45
3.3. Rusticianina	46
a) Función biológica	46
b) Estructura	48
c) Características espectroscópicas	49
3.4. RMN aplicado a BCPs	50
a) BCPs nativas en estado oxidado	50
b) Sondas en RMN para BCPs	52
4. Proteínas que Unen Calcio: Calbindina D <sub>9k</sub>	56
4.1. El Calcio en Sistemas Biológicos	56
4.2. Proteínas Activadoras de Calcio	57
a) Características generales	57
b) Estructura tridimensional	58
c) Función	60
d) Familia S-100	61
4.3. Calbindina D <sub>9k</sub>	62

4.4.	RMN de Proteínas de Calcio	63
	a) Sondas paramagnéticas en RMN para proteínas de calcio	63
	b) Sondas diamagnéticas en RMN para proteínas de calcio	66
<b>II.</b>	<b>Fundamentos Teóricos</b>	<b>69</b>
1.	Cálculo de Estructuras en Sistemas Paramagnéticos	71
1.1.	Cálculo de Estructuras en Sistemas Diamagnéticos	71
1.2.	Restricciones Paramagnéticas	72
	a) Velocidades de relajación longitudinal	73
	b) Desplazamientos de pseudocontacto	75
	c) Desplazamientos de contacto	75
2.	Orientación Molecular	77
2.1.	Acoplamiento Dipolares Residuales	77
2.2.	Tensor de Susceptibilidad Magnética Molecular	81
3.	Dinámica de Proteínas	83
3.1.	Consideraciones Teóricas	83
3.2.	Análisis Model-free	85
3.3.	Dinámica Lenta de Proteínas	87
3.4.	Velocidades de Correlación Cruzada y Movilidad	88
<b>III.</b>	<b>Materiales y Métodos</b>	<b>91</b>
1.	Preparación de Muestras	93
1.1.	Obtención de la Rusticianina	93
	a) Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	93
	b) Extracción y purificación de la proteína	95
	c) Metalación de la apoproteína	96

d) Obtención de los mutantes de rusticianina	97
e) Preparación de las muestras para los estudios de RMN	97
1.2. Obtención de la Calbindina D <sub>9k</sub>	98
a) Cultivo y purificación de la proteína	98
b) Preparación de las muestras	98
2. Experimentos de RMN	100
2.1. Experimentos Homonucleares de RMN	100
a) Monodimensionales simples	100
b) Determinación del efecto NOE	101
c) Experimentos bidimensionales	103
c.1) Basados en el acoplamiento dipolar	103
c.2) Basados en el acoplamiento escalar	104
2.2. Experimentos Heteronucleares para la Detección y Asignación de Señales	104
a) HSQC de <sup>15</sup> N y <sup>13</sup> C	104
b) <sup>15</sup> N HSQC-TOCSY	105
c) HNCA	106
d) HNCO	107
e) <sup>13</sup> C- <sup>13</sup> C COSY	107
f) HCCH-TOCSY	107
2.3. Experimentos Heteronucleares que Proporcionan Restricciones en el Cálculo de Estructuras	108
a) Inversion-recovery HSQC	108
b) HNCO para determinar puentes de hidrógeno	108
c) HNHA	109
d) HNHB	109
2.4. Determinación del Acoplamiento Dipolar Residual	109
2.5. Experimentos para la Determinación de la Movilidad de la Proteína	111

a)	Determinación de la velocidad de relajación longitudinal de $^{15}\text{N}$	111
b)	Determinación de la velocidad de relajación transversal de $^{15}\text{N}$	112
c)	Determinación del NOE $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$	113
d)	Determinación de la $R_2$ ( $1/\tau_{cp}$ ) de $^{15}\text{N}$	114
2.6.	Determinación de las Velocidades de Correlación Cruzada	116
2.7.	Determinación de Moléculas de Agua en la Superficie de la Proteína	117
a)	Protones en intercambio rápido	117
b)	Moléculas de agua estructurales	118
2.8.	Secuencias, Campos y Espectrómetros Utilizados	119
3.	Determinación Estructural	122
3.1.	Susceptibilidad Magnética del Ion Metálico	122
3.2.	Susceptibilidad Magnética Molecular	123
3.3.	Restricciones Obtenidas por RMN	124
a)	Restricciones dipolares	124
a.1)	NOE	124
a.2)	Velocidades de relajación	124
a.3)	Desplazamientos de pseudocontacto	125
a.4)	Acoplamientos dipolares residuales	126
b)	Restricciones escalares	126
b.1)	Constantes de acoplamiento	126
b.2)	Puentes de hidrógeno	127
3.4.	Cálculo de Estructuras	127
4.	Dinámica de Proteínas	129
4.1.	Cálculo de $R_1$ y $R_2$ de $^{15}\text{N}$ y de NOE $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$	129
4.2.	Análisis Model-free	130
4.3.	Dinámica Lenta de Proteínas	130



4.4. Velocidades de Correlación Cruzada	131
<b>IV. Resultados</b>	<b>133</b>
1. Estudio de la Rusticianina de Cobalto(II) mediante RMN de <sup>1</sup> H	135
1.1. Secuencia <i>Invsuperweft</i>	135
1.2. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de Cobalto(II)rusticianina	136
a) Asignación de residuos coordinados	138
b) Asignación de residuos hidrofóbicos no coordinados	142
c) Otras asignaciones	145
1.3. Susceptibilidad Magnética del Ion Cobalto(II)	146
1.4. Residuos con Contribución de Contacto	151
a) Ligandos histidinas	151
b) Ligando cisteína	153
c) Ligando axial	154
d) Serina86	155
1.5. Comparación de Co(II)Rc con otras Co(II)BCPs	156
1.6. Isoleucina140	159
1.7. Potencial Redox	160
2. Estudio de la Rusticianina de Cobre(II) a 800 MHz	164
2.1. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H	164
2.2. Interacción Metal-Ligando en Cu(II)BCPs	168
a) Ligandos histidina	172
b) Ligando cisteína	173
c) Ligando axial	175
d) Serina86	176
2.3. Distribución Electrónica y Geométrica del Centro Activo	177

2.4.	Estructura Electrónica y Estructura Molecular	181
2.5.	Implicaciones en los Potenciales Redox de las BCPs	183
2.6.	Diferencias Metodológicas en el Estudio de Cu(II) y Co(II)Rc	185
3.	Mutantes de la Metionina Axial en Rusticianina	187
3.1.	Mutantes de Cu(II)Rc	187
	a) Espectros superweft	187
	b) Velocidades de Relajación Transversal	190
3.2.	Co(II)Met148Gln Rc	192
3.3.	Efecto del Ligando Axial	194
4.	Dinámica e Hidratación de la Rusticianina	198
4.1.	Velocidades de Relajación de <sup>15</sup> N	198
4.2.	Análisis Model-free	203
4.3.	Velocidades de Correlación Cruzada	206
	a) Rusticianina reducida	207
	b) Rusticianina oxidada	208
4.4.	Accesibilidad del Disolvente	209
	a) Protones de intercambio rápido	209
	b) Intercambio H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O	211
	c) Moléculas de agua estructurales	213
4.5.	Movilidad de Rc comparada con otras BCPs	214
	a) Movilidad del dominio N-35 terminal	214
	b) Otras regiones con movimientos rápidos	215
	c) Movilidad en la escala de tiempo de mili-segundos	216
4.6.	Propiedades Dinámicas del Entorno de Coordinación de Cobre	217
5.	Estructura de CaCeCb: Relevancia de las Restricciones Paramagnéticas	218
5.1.	Clases de Restricciones	219

a) Restricciones de origen diamagnético	220
a.1) NOEs	220
a.2) Ángulos diedros	220
a.3) Puentes de hidrógeno	220
b) Restricciones de origen paramagnético	221
b.1) Velocidades de relajación	221
b.2) Desplazamientos de pseudocontacto	223
b.3) Acoplamientos dipolares residuales	223
5.2. Calidad de la Estructura	224
5.3. Análisis de las Restricciones Paramagnéticas	227
a) Velocidades de relajación longitudinal	229
b) Restricciones de pseudocontacto	230
c) Restricciones derivadas de los acoplamientos dipolares residuales	233
d) Restricciones derivadas de los ligandos del ion paramagnético	234
5.4. Complementariedad de las Restricciones Paramagnéticas	234
5.5. Relevancia de las Restricciones NOE	235
6. Estudios de Desplegamiento Incipiente de la Calbindina D <sub>9k</sub>	238
6.1. Valoración con Cloruro de Guanidinio	238
6.2. Estudios de Movilidad	241
a) Dinámica rápida de Cb D <sub>9k</sub>	241
b) Dinámica lenta de Cb D <sub>9k</sub>	244
c) Protones amida expuestos al disolvente	246
6.3. Modelo Estructural de Cb D <sub>9k</sub> en Cloruro de Guanidinio 2M	246
a) Desplazamientos de pseudocontacto	246
b) Cálculo de estructuras	248
6.4. Características Singulares de Cb en Estado Desplegado Incipiente	250
a) Reorientación de las manos-EF	250

b) Metionina43	251
c) Puente de Hidrógeno Leu23-Val61	252
<b>V. Summary</b>	253
<b>VI. Conclusiones</b>	265
<b>VII. Referencias Bibliográficas</b>	269
<b>VIII. Artículos</b>	297

# I. Introducción



# 1. RMN en Sistemas Biológicos: Breve Revisión Histórica

## 1.1. Nacimiento y Orígenes de la RMN

La primera vez que se observó una señal de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) fue en 1939. Rabi y colaboradores<sup>1,2</sup> hicieron pasar un haz de moléculas de vapor de hidrógeno a través de un campo magnético homogéneo, al mismo tiempo que aplicaban una radiofrecuencia electromagnética. Observaron cómo a una frecuencia fija se producía la absorción de energía electromagnética (señal de RMN) y cómo, consecuencia de ello, se causaba una refracción en las moléculas de hidrógeno. Estas observaciones le valieron a Rabi el Premio Nobel de Física en 1944 “*for his resonance method for recording the magnetic properties of atomic nuclei*”.

No obstante, el nacimiento de la RMN se suele fechar en 1946 y se produjo, de forma simultánea, en dos laboratorios. Bloch, Hansen y Packard<sup>3</sup> comprobaron con una muestra de agua que, si se aplicaba una irradiación electromagnética (pulso) a la magnetización nuclear, ésta se desplazaba de su posición de equilibrio. A continuación, la magnetización rotaba con un movimiento de precesión alrededor del campo magnético aplicado a una frecuencia determinada (*Free Induction Decay*, FID). Al mismo tiempo, en Harvard, Purcell, Torey y Pound<sup>4</sup> consiguieron medir directamente la pequeña absorción de energía de los momentos magnéticos de los protones de un bloque de parafina. En 1952, Bloch y Purcell fueron galardonados con el Premio Nobel de Física “*for their development of new methods for nuclear magnetic precision measurements and discoveries in connection therewith*”.

También en la década de los cuarenta se empezó a diferenciar entre la Resonancia de sólidos y líquidos. Efectivamente, Bloembergen, Purcell y Pound<sup>5</sup> fueron los primeros en explicar los conceptos de la relajación nuclear y en demostrar por qué las señales de RMN de sólidos son mucho más anchas que las de los líquidos. La construcción de los primeros imanes es también de aquella época. En 1948, los hermanos Russel y Sigurd fundaron la compañía Varian y cuatro años después construyeron el primer espectrómetro comercial, que llamaron HR-30 y operaba a 30 MHz para el protón (campo magnético de 7050 G)<sup>6</sup>.

En 1949 se observó que núcleos de  $^{19}\text{F}$  y  $^{31}\text{P}$  absorbían a frecuencias ligeramente diferentes en función del compuesto químico en el que se encontraran. A este fenómeno se le llamó desplazamiento químico. Dos años más tarde los químicos descubrieron la gran aplicabilidad de la RMN como método analítico y estructural con el espectro del etanol, donde aparecían tres señales a desplazamientos químicos diferentes<sup>7</sup>. Poco después Ramsey y Purcell definieron el concepto de acoplamiento espín-espín indirecto o acoplamiento escalar<sup>8</sup>. No obstante, hasta finales de los 50 no se reconoció el valor estructural de estas constantes de acoplamiento, con relaciones como las de Karplus<sup>9</sup>.

Durante estos primeros años de la RMN sólo los físicos utilizaban el método de pulsos, puesto que sus sistemas de estudio constaban de una única línea y la transformada tiempo-frecuencia era relativamente simple. Los sistemas químicos, mucho más complejos, implicaban necesariamente el uso de instrumentos de onda continua.

A principios de los 60 se produjeron tres avances en el ámbito técnico y metodológico. Por un lado, se implementaron los instrumentos con una señal externa a la estudiada (la señal de *lock*) para evitar la deriva del campo. Por otra parte se utilizaron espectrómetros de doble resonancia (existencia de dos radiofrecuencias, una para observar la señal y otra para perturbar el espín). Este implemento en los instrumentos permitió la observación del denominado efecto nuclear Overhauser<sup>10</sup> (*Nuclear Overhauser Effect*, NOE) en 1965. Por último, es también de esta época el amplio desarrollo de la espectroscopía de  $^{13}\text{C}$ .

No obstante, la revolución de la RMN la realizaron Richard R. Ernst y Weston A. Anderson<sup>11</sup> cuando aplicaron la transformada de Fourier a las FIDs, lo que permitió, en la práctica y para sistemas complejos, adquirir intensidades en el dominio del tiempo y transformar estos datos en espectros RMN (intensidad en función de la frecuencia). Gracias a esta metodología el tiempo de adquisición de espectros se acortó en órdenes de magnitud (lo que permitió acumular espectros) y se producía la excitación simultánea de varios núcleos que, a la postre, permitiría la observación de sus acoplamientos. Había nacido (de forma práctica) la RMN de pulsos, es decir, la RMN actual.

Un paso más en la RMN lo constituyó la espectroscopía bidimensional. En 1971 Jean Jeener obtuvo el primer espectro bidimensional de RMN, aunque nunca publicó sus resultados. La única referencia pública a este experimento se hizo en una escuela de verano<sup>12</sup>. Ernst analizó e interpretó esta nueva técnica que bautizó con el nombre de espectroscopía de correlación (*COrrelation Spectroscopy*, COSY)<sup>13</sup>. A finales de los 70, Ernst y Kurt Wütrich ampliaron la espectroscopía 2D a la observación de los acoplamientos dipolares realizando el primer NOESY<sup>14</sup> (*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*). En 1987 Ernst publica (junto con G. Bodenhausen y A. Wokaun) el libro *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*<sup>15</sup>. Cuatro años después, Ernst recibió el premio Nobel de Química “for his contributions to the development of the methodology of high resolution nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy”.



Estos experimentos fueron la base del análisis de biomoléculas que, a partir de los años 80, han permitido elucidar la estructura de miles de proteínas mediante RMN. A continuación describimos brevemente cómo se ha desarrollado la RMN en su aplicación a sistemas biológicos.

## 1.2. RMN en Proteínas

El primer espectro de una proteína (una ribonucleasa) se realizó en 1957<sup>16</sup>. En el espectro, obtenido en un 40 MHz, se observaba una banda ancha no resuelta que contenía más de 800 señales. Al inicio, no era clara la información que, mediante RMN, se podía obtener sobre las moléculas biológicas. Así se estudiaban las proteínas plegadas pero también se hacían estudios de desnaturalización<sup>17</sup>. Estos estudios permitieron realizar la asignación de señales individuales y establecer algunas diferencias para distinguir los dos estados<sup>18</sup>.

Pronto se vio también la aplicabilidad de la RMN en la caracterización dinámica de proteínas y ácidos nucleicos. Se comenzaron a estudiar las interacciones de macromoléculas biológicas con pequeños ligandos, puesto que la interacción provocaba cambios en los desplazamientos químicos y/o en la anchura de las señales<sup>19</sup>. Tras la identificación de los primeros protones de histidina<sup>20</sup>, se propuso el marcaje isotópico como técnica de asignación<sup>21</sup>. De este modo se obtenía mayor resolución en los espectros<sup>22</sup>. En 1967 McDonald y Phillips<sup>23</sup> obtuvieron el primer espectro de una proteína con un espectrómetro de alto campo. A pesar de todo, la baja resolución de los espectros monodimensionales para macromoléculas que poseen un número muy elevado de núcleos, limitaba el uso de estos espectros a la obtención de información de las histidinas que aparecen desplazadas en una zona del espectro poco concurrida.

En 1975 Gibbons<sup>24</sup> consiguió asignar, por primera vez, una proteína completa mediante la realización de medidas de constantes de acoplamiento y de NOEs 1D del esqueleto de la proteína. Es en esta época cuando en el Laboratorio de Kurt Wüthrich se desarrolla la metodología para la asignación secuencial específica de las señales de RMN<sup>25</sup>. Así mismo, como hemos comentado anteriormente, en 1979 se realizó, en ese mismo Laboratorio (en un espectrómetro de 360 MHz), el primer experimento NOESY<sup>14</sup>. Durante los años 80-83 el equipo de Wüthrich (entre los que se encontraban R. Wagner, R.M. Keller, S.L. Gordon y M. Billiter) crea los algoritmos (programas informáticos) para el cálculo de estructuras de biomoléculas a partir de datos de RMN mediante la denominada "geometría de distancias"<sup>26</sup>. En 1984 resuelven, por primera vez, la estructura de una proteína en disolución a resolución atómica, concretamente el inhibidor de la proteasa seminal de toro (BUSI)<sup>27</sup> (Figura 1). Sin embargo, como estos resultados coincidían con los de una proteína homóloga resuelta por cristalografía de Rayos X, no hubo una aceptación general de la comunidad científica. En 1986, Wüthrich publica *NMR of Proteins and Nucleic Acids*<sup>28</sup>, libro base para todo aquél que ha trabajado en estructura de proteínas o ácidos nucleicos mediante RMN. En 1988 su grupo

resolvió la estructura del inhibidor de la  $\alpha$ -amilasa en disolución<sup>29</sup>. Esta estructura coincidía plenamente con la que, de forma paralela e independiente, resolvió el laboratorio de Robert Huber (Premio Nobel de Química en 1988) para esa misma proteína mediante difracción de rayos X. De esta forma quedó demostrada la aplicabilidad de la RMN en la solución de estructuras de proteínas. Wüthrich recibió el Premio Nobel de Química en 2002 “*for his development of nuclear magnetic resonance spectroscopy for determining the three-dimensional structure of biological macromolecules in solution*”. Actualmente, de las más de 18000 estructuras de biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, complejos de ambos, e incluso carbohidratos) depositadas en el Banco de Datos de Proteínas (PDB), algo más de 2800 (más del 15 %) han sido resueltas por esta técnica<sup>30</sup>. Así mismo esta metodología se ha extendido a la elucidación de estructuras tridimensionales en disolución para ácidos nucleicos<sup>31</sup> y oligosacáridos<sup>32</sup>.



**Figura 1.** Estructura tridimensional de la proteasa seminal de toro (BUSI) (archivo 1BUS.pdb<sup>27</sup>). Primera estructura resuelta por RMN.

Simultáneamente se desarrollaron muy diversas secuencias de pulsos homonucleares. De entre éstas destacaremos el denominado TOCSY<sup>33</sup> (*Total Correlation Spectroscopy*) por su indudable aplicabilidad en la determinación de los sistemas de espín, es decir, núcleos relacionados covalentemente entre sí. Durante estos años comienzan a desarrollarse y aplicarse secuencias de pulsos basadas en el principio INEPT<sup>34</sup> (*Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer*) y gracias a las cuales un núcleo de poca sensibilidad (el carbono-13 o el nitrógeno-15 en proteínas) “marca” o “etiqueta” su frecuencia en la frecuencia del núcleo observado, de mayor sensibilidad (el protón). Este método permitió la aplicación de secuencias heteronucleares como la HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*) y HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*)<sup>35</sup> que son, a su vez, el punto de partida de la gran mayoría de secuencias heteronucleares tridimensionales (a excepción de las basadas en el fenómeno de correlación cruzada, ver más adelante). Estas últimas empezaron a aplicarse a finales de los 80<sup>36-38</sup>, aunque su desarrollo, que

consistió en la excitación de tres núcleos simultáneamente ( $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ), no se produjo hasta principios de los años 90<sup>39-44</sup>.

También en esta época se desarrollaron métodos basados en secuencias heteronucleares para la medida muy precisa de constantes de acoplamiento a tres enlaces,  $^3J$ <sup>45</sup>. Mediante estas constantes de acoplamiento y las relaciones de Karplus correspondientes<sup>46</sup> es posible determinar el valor de los ángulos diedros del esqueleto y de las cadenas laterales de una proteína. Dos métodos diferentes se desarrollaron con este fin: el primero basado en el principio denominado ECOSY<sup>47</sup>, en el que se mide directamente el valor de la constante a partir del desdoblamiento de los multipletes observados en un experimento 2D; y el segundo, cuantitativo, que relaciona el valor de  $J$  con las intensidades de las señales observadas<sup>48,49</sup>.

La aplicación de estas secuencias de pulsos iba en paralelo tanto al incremento del campo magnético de los espectrómetros como al desarrollo de la Biología Molecular, gracias a la cual se podían obtener moléculas doblemente marcadas. Un avance técnico importante también en esos años fue el uso de gradientes<sup>50</sup> que permiten seleccionar coherencias de forma independiente al ciclo de fases, reenfocar las coherencias deseadas y eliminar artefactos. Todo ello condujo a un importante aumento en el límite máximo del peso molecular de las proteínas cuya estructura podía resolverse mediante RMN, que pasó a ser, hacia mitad de la década pasada, de unos 25 kDa<sup>51,52</sup>.

Debemos también resaltar que, junto con el desarrollo de la RMN heteronuclear, se redescubrió la aplicabilidad de esta técnica no sólo en el aspecto estructural, sino también respecto a la información dinámica que proporciona en proteínas. La RMN todavía va muy por detrás de la cristalografía de Rayos X respecto a la resolución de estructuras, sin embargo esta última técnica no proporciona información sobre la movilidad de los residuos. A finales de los 80, el grupo del Prof. Ad Bax desarrolló diversas secuencias de pulsos que permitieron determinar las velocidades de relajación de los núcleos de nitrógeno-15 en proteínas<sup>53-55</sup>. Estos parámetros son idóneos para determinar las regiones de la proteína con diferente movilidad.

En los últimos años los avances técnicos y teóricos han permitido dar enormes pasos en la metodología de RMN aplicada a proteínas. Respecto al primer avance, hemos de recordar que el límite de la aplicabilidad de la RMN radica, en un alto grado, en la sensibilidad de los instrumentos de medida. Dos factores han incrementado de forma espectacular la sensibilidad de los espectrómetros y la aplicabilidad de la técnica en los últimos años. Por un lado, el aumento del campo magnético. De hecho, el uso de espectrómetros de campos magnéticos de 18.8 Tesla (800 MHz) es ya general en Europa, Norteamérica y Japón. Existen también espectrómetros de 900 MHz operativos. Por otra parte, el uso de las actuales criosondas permite, para un campo dado, aumentar la relación señal/ruido del espectrómetro en un orden de magnitud.

Pero la sensibilidad no sólo depende del campo magnético aplicado. La anchura intrínseca de las señales de estudio, que se incrementa sustancialmente con el peso molecular de la proteína, dificulta no sólo la observación de las mismas señales sino también de sus acoplamientos. Para evitar

parcialmente este efecto ya se había recurrido previamente al marcaje deuterado de proteínas<sup>56</sup>. No obstante, los avances teóricos a los que nos referíamos anteriormente consisten en un experimento y dos fenómenos físicos que han revolucionado, otra vez más, el mundo de la RMN, ampliando las perspectivas actuales sobre los límites de su aplicabilidad. En primer lugar, hace seis años, Wüthrich ideó el método denominado TROSY<sup>57</sup> (*Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy*). En una proteína marcada y en un experimento sin desacoplar, la señal de un protón acoplado a un núcleo de nitrógeno-15 da lugar a cuatro señales (debidas al desarrollo del acoplamiento  $J_{HN}$  durante la evolución y la adquisición). El experimento TROSY selecciona únicamente la transición que relaja más lentamente (la más estrecha), aumentando la relación señal/ruido, es decir, la sensibilidad del experimento.

Por otra parte la relajación transversal (anchura de las señales) en sistemas de alto peso molecular depende fundamentalmente del acoplamiento dipolo-dipolo y de la anisotropía del desplazamiento químico (Capítulo 3 de Fundamentos Teóricos). Ambos efectos aumentan con el campo magnético y con el tamaño molecular. En 1999 Wüthrich ideó un experimento, basado en este fenómeno, denominado CRINEPT<sup>58</sup> (*Cross Relaxation-Enhanced Polarization Transfer*), que explota la correlación existente entre estos fenómenos y que permite, de forma distinta a la determinada mediante experimentos tipo INEPT, relacionar núcleos acoplados. La correlación cruzada en la que se basa este experimento aumenta con el campo, lo que les permitió asignar una proteína de 110 kDa<sup>58</sup>.

Finalmente el descubrimiento de que no sólo los núcleos sino las mismas moléculas se orientan en un campo y que dicha orientación puede medirse experimentalmente mediante los denominados acoplamientos dipolares residuales<sup>59</sup> (Capítulo 2 de Fundamentos Teóricos) ha permitido un paso más en la aplicabilidad de la técnica. La orientación abre paso a la resolución de estructuras no basadas directamente en el efecto NOE<sup>60</sup>.

Hemos intentado realizar una breve exposición de cómo la RMN ha evolucionado desde sus orígenes. En la presente Tesis se muestran muchos ejemplos de los experimentos comentados en este apartado. No obstante, es también interesante describir cómo los grupos que han trabajado en sistemas paramagnéticos mediante RMN han ido aplicando (quizá con algo de retraso) estos descubrimientos a moléculas con electrones desapareados.

### **1.3. RMN e Iones Paramagnéticos**

La existencia de iones paramagnéticos en una molécula era, históricamente, un inconveniente para su estudio mediante RMN, puesto que el aumento de la velocidad de relajación transversal se traduce en un ensanchamiento de las señales con la consiguiente pérdida de información en el entorno del ion metálico. El desarrollo de la técnica de RMN aplicado a estos sistemas ha cambiado la

perspectiva de enfrentarse a ellos. Actualmente, gracias a los trabajos realizados por un número relativamente pequeño (en comparación con los que se dedican a RMN en general) de grupos de investigación, la RMN de sistemas paramagnéticos es un método (más que una técnica propiamente dicha) para aprovechar la existencia de los efectos causados por los electrones desapareados. De esta forma se pueden utilizar estos efectos con el fin de rescatar información perdida en RMN de sistemas diamagnéticos. La presente Tesis quiere constituir, en este sentido, un buen ejemplo. Comentamos brevemente a continuación cómo se ha ido avanzando en el estudio mediante RMN de sistemas paramagnéticos y, más concretamente en proteínas, desde los orígenes hasta la actualidad.

En los años 50 el desarrollo conjunto de la RMN, comentada ampliamente en el apartado anterior y de la Resonancia de Espín Electrónico (*Electron Paramagnetic Resonance*, EPR) condujo al tratamiento teórico del acoplamiento espín electrónico–espín nuclear en presencia de un campo magnético. McConnell y Chesnut<sup>61</sup> describieron, en 1958, el denominado desplazamiento isotrópico o hiperfino (apartado 2.2), es decir, el desplazamiento químico experimentado por núcleos resonantes en presencia de iones paramagnéticos. Así mismo, definen la dependencia de la contribución de contacto (apartado 2.3) con las propiedades electrónicas y la constante de acoplamiento hiperfino (ecuación 6). También se deben a McConnell las primeras relaciones matemáticas entre el acoplamiento dipolar y el desplazamiento hiperfino<sup>62</sup> (apartado 2.2). Es en esta época cuando Solomon deriva la dependencia del tiempo de relajación longitudinal nuclear con la distancia electrón-núcleo (ecuación 16)<sup>63</sup>. Bloembergen<sup>64</sup> dedujo, en aquellos años, la dependencia del tiempo de relajación transversal, es decir de la anchura de línea en un espectro de RMN, con, entre otros parámetros, la distancia metal-núcleo en un sistema paramagnético (ecuación 17). En definitiva, los principios físicos por los que se regían los núcleos resonantes en presencia de electrones desapareados en un campo magnético fueron bien establecidos ya en la década de los 50.

Los primeros estudios experimentales de RMN de sistemas paramagnéticos se llevaron a cabo en estado sólido. Concretamente, mediante RMN de <sup>19</sup>F en cristales de MnF<sub>2</sub><sup>65,66</sup>, MnF<sub>3</sub><sup>67</sup> y FeF<sub>2</sub><sup>68,69</sup>. En estos estudios confrontaban los desplazamientos isotrópicos experimentales con la estructura electrónica de los iones Mn(II) y Fe(II) y la teoría recientemente establecida. Un estudio similar con complejos de fósforo mediante RMN de <sup>31</sup>P en estado sólido también se realizó en esa época<sup>70</sup>. A finales de los 50 comenzaron los estudios en disolución. Shulman investigó la variación con la temperatura del desplazamiento químico del <sup>14</sup>N (núcleo cuadrupolar, momento de espín  $I=1$ ) para el complejo Mn(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup><sup>71</sup>. Ya entrados en los 60, se llevaron a cabo numerosos estudios sobre diversos complejos de metales de transición utilizando RMN heteronuclear. Los núcleos más frecuentemente usados eran el <sup>19</sup>F<sup>72-74</sup>, el <sup>31</sup>P<sup>75,76</sup>, el <sup>13</sup>C<sup>77-79</sup>, el <sup>35</sup>Cl<sup>80,81</sup> y el <sup>2</sup>H<sup>82,83</sup>. Normalmente se determinaban los desplazamientos isotrópicos que producían los diversos metales de transición en los núcleos confrontando los valores obtenidos en presencia y en ausencia de ellos, así como en función de la temperatura. De esta forma se computaba la contribución de los factores dipolar y de contacto al desplazamiento observado. Así mismo se obtenía información sobre la estructura electrónica del metal y, en su caso, sobre la dinámica fluxional del complejo.

McConnell y Holm realizaron los primeros estudios en disolución de los desplazamientos químicos de protón causados por iones paramagnéticos<sup>84,85</sup>. Sus sistemas de trabajo fueron los metallocenos de vanadio,  $V(C_5H_5)_2$ , y cromo,  $Cr(C_5H_5)_2$ . Observaron que estos dos metales (en estado de oxidación cero) producían grandes desplazamientos a campo bajo de los protones de los anillos ciclopentadienilo. A principios de los 60 se empezaron a realizar los primeros espectros de  $^1H$  en disolución de complejos de iones de transición. Casi siempre se trataba de pequeños complejos organometálicos, fundamentalmente de Ni(II), Fe(III), Co(II) y Mn(II)<sup>86-89</sup>. Para la asignación de las señales se basaban en: i) la relación existente entre la anchura de las señales observadas y la distancia protón-metal (ecuaciones 17 y 20, Capítulo 2); ii) sustituciones de ligandos con similar estructura molecular; iii) la dependencia con la temperatura de las señales; iv) el marcaje isotópico; y, en algunos casos, v) técnicas de doble resonancia. Las conclusiones de estos estudios versaban sobre las contribuciones de contacto y dipolar al desplazamiento hiperfino en cada complejo, la confirmación o no de los modelos teóricos y la distribución de densidad de espín electrónico desapareado sobre los ligandos. También se estudiaban con todo detalle los fenómenos dinámicos, preferentemente, aquellos que afectaban a un intercambio entre una especie diamagnética y una especie paramagnética, verbigracia: el equilibrio entre el níquel(II) cuadrado-plano y el níquel(II) tetraédrico<sup>90</sup> o el equilibrio debido a la transferencia electrónica entre iones Fe(II), diamagnético y Fe(III), paramagnético<sup>91</sup>. Así mismo, se investigaron fenómenos dinámicos como el intercambio de un ligando entre el disolvente y la esfera de coordinación del ion metálico<sup>92</sup>.

En los años 60 también se descubren los lantánidos como agentes capaces de producir grandes desplazamientos químicos en los núcleos resonantes. Lewis y colaboradores estudian los desplazamientos de  $^{17}O$  en la serie  $Ln(H_2O)_9$ <sup>93</sup>. Comparando estos desplazamientos para diversos lantánidos separan la contribución de contacto y dipolar. A su vez, Muetterties y colaboradores estudian, por primera vez, los desplazamientos químicos del  $^1H$  en complejos tritropolonato de los metales de tierras raras<sup>94</sup>. Dos años después se amplía este tipo de estudios al núcleo de  $^{31}P$ <sup>95</sup>. También los actínidos han sido utilizados como agentes de contraste de desplazamiento químico. Concretamente el catión uranilo,  $UO_2^{2+}$ , fue el primer catión de un actínido utilizado en este sentido<sup>96</sup>. Así mismo se utilizaron otros iones de esta serie de tierras raras como U(III), Pu(III), U(V) y Np(V)<sup>97-99</sup>.

Es hacia finales de los 60 y principios de los 70 cuando comienza una pequeña explosión de datos en complejos paramagnéticos en disolución. De hecho, de los escasos seis artículos publicados en 1960 sobre este tema se pasó a más de 150 en 1970. En 1973, La Mar, Horrocks y Holm editan el libro *NMR of Paramagnetic Molecules: Principles and Applications*<sup>100</sup>, donde por primera vez se sistematizan los conocimientos adquiridos, teóricos y experimentales, sobre este tema. Es también a partir de estos primeros años 70 cuando la RMN de paramagnéticos se vuelca hacia el estudio de sistemas biológicos. Comentamos aquí someramente la evolución de la RMN de paramagnéticos para estos sistemas y, más concretamente, para proteínas. Esta evolución ha ido paralela, aunque siempre con algunos años de retraso, a la RMN aplicada a sistemas diamagnéticos.

Dos han sido los sistemas nativos más ampliamente estudiados mediante RMN de paramagnéticos: los citocromos y las proteínas hierro-azufre. Así mismo se han aprovechado ciertos iones metálicos como sondas espectroscópicas para el estudio de muy diversos sistemas biológicos. Aquí destacaremos los más relevantes con respecto a la presente Tesis, que son también, probablemente, los que más se han utilizado, a saber: el cobalto(II) y los iones lantánidos.

Comenzaremos, pues, resumiendo brevemente la información obtenida de diversos tipos de citocromos mediante RMN de paramagnéticos. El primer espectro de RMN de  $^1\text{H}$  en proteínas con desplazamientos hiperfinos lo realizó Kowalsky en 1965<sup>101</sup>. Concretamente, estudió el citocromo *c* y la mioglobina. En dicho espectro se podían observar señales de protones desplazados de la gran señal envolvente del entorno diamagnético, debido al desplazamiento hiperfino. En los citocromos los anillos pirrólicos de la porfirina confieren al ion hierro una simetría axial. Cuando el ion hierro es hexacoordinado, porque existen dos ligandos axiales en la proteína que lo coordinan (como sucede en los citocromos *c*), normalmente se trata de un ion de bajo espín<sup>102-105</sup>. En estado reducido, el Fe(II) de bajo espín es diamagnético ( $S=0$ ), mientras que en estado oxidado, el Fe(III) de bajo espín es paramagnético, con un solo electrón desapareado ( $S=1/2$ ). Las propiedades electrónicas de un Fe(III) de bajo espín hacen de él un ion con una relajación electrónica muy eficiente<sup>106-108</sup>. En consecuencia, los núcleos que sienten su efecto tienen tiempos de relajación relativamente largos (superiores a 30 ms para la mayoría de los protones)<sup>106,107,109</sup> lo que facilita la asignación de las señales. Por este motivo, desde un principio se recurrió a este tipo de sistemas en el tratamiento de RMN de paramagnéticos<sup>110,111</sup>. Más aún, también se había observado, ya por aquella época, que si la velocidad de transferencia electrónica es apropiada, el intercambio Fe(II)/Fe(III) entre una especie diamagnética y una paramagnética facilita también la asignación de estos citocromos<sup>112-114</sup>, así como la obtención de valiosa información cinética sobre ellos. Estudios de citocromos y porfirinas pentacoordinadas y, en consecuencia, de alto espín ( $S=5/2$  en estado oxidado, como la mioglobina y la hemoglobina) también se estudiaron por RMN de paramagnéticos, mediante la adición de iones cianuro<sup>115-118</sup>, que convierten el ion Fe(III) en bajo espín ( $S=1/2$ ).

Posteriormente, la sensibilidad de los instrumentos avanzó lo suficiente para que incluso se pudieran estudiar iones Fe(III) de alto espín directamente<sup>119-122</sup>. En estos sistemas con cinco electrones desapareados ( $S=5/2$ ), los protones pueden tener tiempos de relajación entre 2 y 30 ms, comparados con el intervalo 30-150 ms para los mismos protones en un Fe(III) de bajo espín. Aún así, hasta los años 80, las asignaciones, basadas en la mayoría de los casos en la relación entre las velocidades de relajación longitudinal y la distancia al centro metálico (ecuación 16), así como marcaje isotópico con  $^2\text{H}$ , se llegaban a realizar en alto grado<sup>123,124</sup>.

Como acabamos de indicar, el Fe(III) de bajo espín es, de entre todos los sistemas paramagnéticos conocidos, el más agradecido. El desarrollo de la RMN de paramagnéticos ha tenido lugar en buena medida utilizando estos sistemas. En efecto, la espectroscopía de intercambio Fe(II)/Fe(III) ya se realizaba con éxito en los años 70 en estos sistemas<sup>112-114</sup> y se desarrolló en los años 80<sup>125-127</sup>. A mediados de los 80 el Profesor La Mar (Universidad de Davis, California) desarrolla

la metodología para observar NOEs 1D basados en fenómenos de intercambio<sup>128</sup>. La dificultad de realizar estos experimentos en sistemas paramagnéticos radicaba (y todavía radica) en la pequeña intensidad de los NOEs observados y la alta estabilidad necesaria en los instrumentos para obtener un espectro diferencia NOE 1D observable. En 1984, el grupo del Prof. Xavier realizó el primer experimento 2D en un sistema paramagnético<sup>129</sup>. Se trataba de un experimento EXSY (*EXchange Spectroscopy*) realizado sobre un citocromo *c*<sub>3</sub> de bajo espín. Es también el grupo del Prof. La Mar quien, a finales de los 80, realiza los primeros experimentos NOESY en sistemas paramagnéticos, concretamente en el citocromo *b*<sub>5</sub><sup>130</sup> y en la cianometmioglobina<sup>131</sup>. La secuencia NOESY<sup>132</sup> no es prácticamente efectiva para núcleos con tiempos de relajación inferiores a 3 ms, por lo que en RMN de paramagnéticos siempre ha sido más eficaz el empleo de NOEs 1D<sup>133</sup>. La secuencia TOCSY en paramagnéticos tiene dos inconvenientes adicionales. En primer lugar, los tiempos de relajación transversales (de los que depende esta secuencia) son, lógicamente, menores que los longitudinales, luego se trata de un experimento más crítico aún que el NOESY. En segundo lugar, los pulsos suaves empleados en el tiempo de *spin lock* no son efectivos para ventanas grandes. Por este motivo el TOCSY se emplea únicamente para la denominada zona “pseudo-diamagnética” (Capítulo 2).

Los sistemas de Fe(III) de bajo espín tienen una alta anisotropía magnética<sup>106,107</sup>. Esto les ha hecho también idóneos para el estudio del desplazamiento dipolar de los núcleos cercanos, para el cálculo del tensor de anisotropía magnética (apartado 2.3) y para introducir estos parámetros como restricciones en el cálculo estructural (Capítulo 1 de Fundamentos Teóricos). Aunque la anisotropía magnética en estos sistemas se estudiaba ya desde antiguo vía RMN<sup>134,135</sup>, no fue hasta 1990 cuando el laboratorio del Prof. La Mar obtuvo la orientación del tensor de anisotropía magnética en la cianometmioglobina<sup>136</sup>. Posteriormente otros grupos<sup>137</sup> han obtenido también este tensor en otros sistemas de Fe(III) de bajo espín. No obstante, ha sido el grupo del Profesor Bertini (Universidad de Florencia, Italia) quien utilizó por primera vez las restricciones dipolares derivadas de la anisotropía magnética en el cálculo estructural<sup>138-142</sup>. En este sentido un paso más allá fue la colocación del metal y del anillo de protoporfirina en su ubicación exacta en el plegamiento de la proteína basado en estos acoplamiento dipolares. Este estudio sirvió, así mismo, para implementar el programa de cálculo de estructuras DYANA<sup>143</sup> (Capítulo 1 de Fundamentos Teóricos) con restricciones de pseudocontacto (programa PSEUDYANA<sup>144</sup>, Capítulo 1 de Fundamentos Teóricos). El último paso ha consistido en aprovechar las restricciones proporcionadas por los acoplamiento dipolares residuales (*residual dipolar couplings, rdc*, Capítulo 2 de Fundamentos Teóricos) para la resolución de estructuras sin restricciones tipo NOE<sup>145-147</sup>. En el Capítulo 5 de Resultados se discute este punto.

Las proteínas hierro-azufre<sup>103-105</sup> (ferredoxinas, cuando se trata de proteínas de bajo potencial redox, o HiPIP, *High Potential Iron-sulfur Protein*, Proteínas de Hierro de Alto Potencial) han sido, sin duda alguna, el otro sistema biológico donde la RMN de paramagnéticos más se ha aplicado y del que mayor información se ha obtenido. Efectivamente, en estas proteínas (salvo en la rubredoxina o desulforredoxina, con un único ion hierro) existe acoplamiento magnético entre los iones hierro que forman el centro activo<sup>103-105</sup>. En proteínas hierro-azufre con dos espines electrónicos (magnéticos)



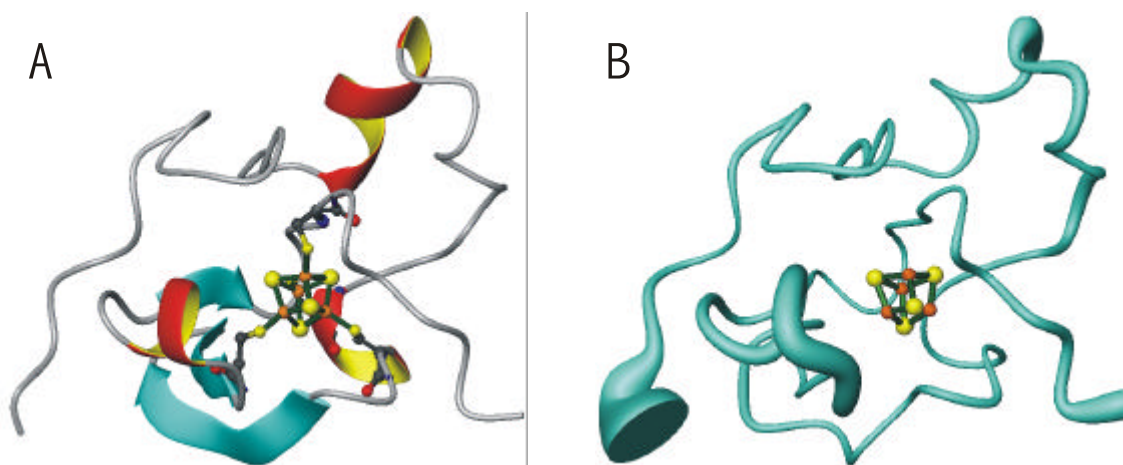
diferentes, el espín mayor se orienta favorablemente al campo magnético y el menor se acopla antiferromagnéticamente al primero, es decir, de forma antiparalela con el campo externo<sup>148</sup>. Esto produce que los núcleos cercanos al espín mayor aparezcan a campo bajo y, además, tengan un comportamiento con la temperatura denominado Curie (a mayor temperatura, menor desplazamiento observado; a temperatura infinita, desplazamiento nulo). Por el contrario, los núcleos cercanos al espín menor pueden aparecer a campo alto y tienen un comportamiento anti-Curie (un aumento de la temperatura aumenta el desplazamiento químico)<sup>149-152</sup>. Todas estas observaciones produjeron una fuente de información sustancial, no sólo en el conocimiento magnético de estos sistemas sino también en la relevancia fisiológica (en la transferencia electrónica) de estos acoplamientos. En efecto, cuando la asignación específica de los protones pertenecientes a los ligandos cisteínas fue posible<sup>152-157</sup>, la RMN de paramagnéticos permitió elucidar específicamente cuál de los iones hierro se reducían u oxidaban en el proceso redox biológico. Esta información sólo la proporciona la RMN. Ninguna otra técnica espectroscópica puede decirnos qué ion de hierro (el coordinado a ciertas cisteínas en la secuencia primaria) es activo en el proceso redox.

Es también de destacar que con proteínas hierro-azufre se empezaron a estudiar otros núcleos como el <sup>15</sup>N, el <sup>13</sup>C y el deuterio en RMN de paramagnéticos<sup>158-161</sup>. En la RMN de sistemas diamagnéticos estos heteronúcleos suelen utilizarse para eliminar solapamientos (introduciendo una nueva dimensión, es decir, mayor resolución) en proteínas de alto peso molecular o para estudios dinámicos. En RMN de paramagnéticos los heteronúcleos son útiles además, porque, debido a su menor razón giromagnética, sus velocidades de relajación transversal están menos afectadas por los electrones desapareados (ecuación 17) y, en consecuencia, se observan allá donde el protón ya no puede ser detectado. Esto permitió, entre otros avances, la determinación de núcleos que forman enlaces de hidrógeno con los iones sulfuros del metal en ferredoxinas<sup>162</sup>.

Los sistemas hierro-azufre han sido también sistemas de prueba de la metodología de RMN de paramagnéticos. En efecto, la primera estructura en disolución de una proteína paramagnética se resolvió en el laboratorio del Profesor Bertini. Concretamente fue la correspondiente a la HiPIP I de *Ectothiorhodospira halophila*<sup>163</sup> (Figura 2). Así mismo, estas ferredoxinas han servido para introducir restricciones derivadas del desplazamiento hiperfino de contacto<sup>164</sup> y de las velocidades de relajación longitudinal<sup>164-167</sup>) en el cálculo de estructuras. En estos sistemas, la geometría cúbica de los clústers hace que posean una muy baja anisotropía magnética, por lo que el desplazamiento de pseudocontacto es mínimo y no es posible aplicar este tipo de restricciones paramagnéticas en el cálculo de estructuras.

La RMN en sistemas biológicos también ha aprovechado la afinidad que muchas moléculas de origen biológico muestran por iones extrínsecos o no nativos. Esta Tesis en parte (Capítulos 1, 5 y 6 de Resultados) es también un ejemplo de este tipo de sistemas y de la información que puede obtenerse mediante esta técnica. El cobalto(II) se ha utilizado ampliamente con este fin<sup>169-173</sup>. Efectivamente, el ion cobalto es un buen sustituto del ion cinc y ha sido extensamente empleado en metaloenzimas de este ion metálico. Las enzimas de cinc carboxipeptidasa A<sup>174,175</sup>, alcohol

deshidrogenasa<sup>176,177</sup>, anhidrasa carbónica<sup>178-180</sup>, así como la CuZn superóxido dismutasa<sup>133,181,182</sup> han sido sustituidas por cobalto y estudiadas mediante RMN de <sup>1</sup>H. En la CuCoSOD, el acoplamiento del ion cobre(II) con el cobalto(II) aumenta la relajación electrónica del primero (Capítulo 2 de Introducción) y permite obtener señales estrechas y bien resueltas, incluso para los núcleos cercanos al ion Cu(II). En la anhidrasa carbónica se detectaron, por primera vez, efectos de correlación cruzada entre protones en un sistema paramagnético en un espectro COSY<sup>183,184</sup>. El efecto de la correlación cruzada en sistemas con  $S \approx 1$  es mayor que el posible acoplamiento escalar entre protones (COSY real), por lo que el experimento COSY fue, desde entonces, descartado para la asignación de señales en estos sistemas paramagnéticos.



**Figura 2.** Estructura tridimensional de la proteína hierro-azufre de alto potencial (HIPIP) de *Ectothiorhodospira halophila* (archivo 1PIH.pdb<sup>168</sup>). Primera estructura de una proteína paramagnética resuelta por RMN. A) Representación de los elementos de la estructura secundaria (hélices- $\alpha$  en rojo y hebras- $\beta$  en celeste); B) Representación denominada "salchicha" donde el diámetro de la cadena está relacionado con la resolución de la familia de estructuras (a mayor diámetro, menor resolución). En ambos casos se señala el clúster hierro-azufre, los iones hierro se representan en naranja y los iones azufre en amarillo.

Mención específica debe hacerse en esta Tesis a la sustitución metálica de Proteínas Azules de Cobre (BCPs, Capítulo 3 de Introducción y Capítulos 1 y 3 de Resultados). Por las razones expuestas en el apartado 2.5, el ion cobre(II) no es un buen ion para RMN de paramagnéticos. Se ha recurrido, pues, desde hace tiempo a su sustitución metálica. La azurina fue la primera proteína que se estudió mediante RMN de <sup>1</sup>H en los derivados sustituidos de cobalto(II)<sup>185,186</sup> y níquel(II)<sup>187</sup>. No obstante, no hubo asignación de señales en ninguno de estos trabajos puesto que las técnicas 1D NOE y bidimensionales no se aplicaban todavía a sistemas paramagnéticos. No fue hasta el año 1992, en el que nuestro grupo de investigación retomó este tipo de estudios en BCPs, cuando se asignaron los derivados de Ni y Co de Az<sup>188-191</sup>. Posteriormente el grupo del Dr. Vila (Universidad de Rosario, Argentina) también se introdujo en el tema de BCPs sustituidas estudiando la estelacianina<sup>192-194</sup>. E

grupo del Profesor Canters (Universidad de Leiden, Holanda), sin duda alguna uno de los grupos más relevantes en el estudio termodinámico, cinético, estructural y funcional de proteínas azules de cobre también comenzó por aquellos años a trabajar con RMN de paramagnéticos en BCPs metalosustituidas<sup>195-197</sup>. Es en este laboratorio donde, por primera vez se caracterizan estas proteínas en su estado nativo, Cu(II), mediante experimentos de transferencia electrónica (apartado 3.4)<sup>198</sup>. Estos experimentos dieron un paso cualitativo importante cuando, a finales de los 90 se aplica por primera vez el denominado “NOE ciego”<sup>199</sup> que permitió la detección de señales incluso sin ser observadas (apartado 3.4).

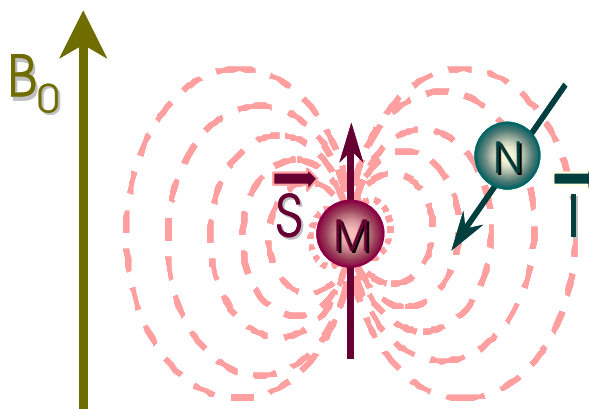
Hemos dejado para el final de nuestra Introducción los iones lantánidos. Estos iones se caracterizan (apartado 2.5) por poseer una alta anisotropía magnética y, en consecuencia, por producir grandes desplazamientos químicos en los protones cercanos al ion metálico. A finales de los años 60 y principios de los 70 se comienzan a estudiar ampliamente diversos complejos de iones lantánidos con ligandos orgánicos<sup>200-205</sup>. Bleaney<sup>206</sup> explica en aquella época la dependencia de los desplazamientos de pseudocontacto en sistemas de lantánidos con su estructura electrónica (apartado 4.4). También es a principios de los 70 cuando se aplican los lantánidos como reactivos de desplazamiento químico en proteínas, concretamente en la lisozima<sup>207,208</sup>. No obstante, es a finales de esta década, cuando se descubre que los lantánidos pueden ser utilizados, muy eficazmente, sustituyendo al calcio en proteínas de este ion metálico<sup>209,210</sup>. La proteína paralbúmina fue la primera en ser estudiada mediante RMN en disolución por sustitución de uno de sus iones calcio por iones lantánidos<sup>211-215</sup>. A principios de los 90, el grupo de Florencia comienza sus trabajos con iones lantánidos en proteínas<sup>216</sup> y desde 1997 este grupo ha demostrado la aplicabilidad de estos iones como fuente de información estructural<sup>217-222</sup>.

Hay que resaltar, en este sentido, que el uso de lantánidos como sondas espectroscópicas, debido a la alta anisotropía de estos iones, inducen, a alto campo, la orientación intrínseca de las moléculas en disolución y acoplamiento dipolares residuales (*residual dipolar couplings, rdc*) detectables (Capítulo 2 de Fundamentos Teóricos). En esta Tesis también se comenta el uso de estas restricciones como información estructural (Capítulo 5 de Resultados).

## 2. RMN en Sistemas Paramagnéticos

### 2.1. Interacción Núcleo-Electrón

La presencia de electrones desapareados en una molécula genera un campo magnético mucho más intenso que el observado en un sistema análogo diamagnético (Figura 3). Estos electrones desapareados interactúan con los núcleos resonantes modificando sus niveles de energía y la relajación existente entre ellos. Como consecuencia, sus parámetros de RMN (desplazamiento químico y relajación longitudinal y transversal) se ven afectados sustancialmente.



**Figura 3.** Momento magnético originado por el espín electrónico,  $S$ , en un campo magnético,  $B_0$ . El campo magnético observado por el núcleo resonante  $N$  es diferente al que observaría en ausencia de  $S$ .

## 2.2. Acoplamiento Hiperfino

Los desplazamientos químicos y la relajación en sistemas diamagnéticos se deben esencialmente al efecto de apantallamiento del campo magnético de los electrones que rodean a cada núcleo resonante. La existencia de electrones desapareados (con espín electrónico  $S$ ) altera sustancialmente el campo magnético observado por estos núcleos resonantes (con espín electrónico  $I$ ; Figura 3). La interacción espín electrónico-núcleo resonante, denominada acoplamiento hiperfino, modifica los niveles de energía y la relajación de dicho núcleo.

La descripción mecanocuántica de este acoplamiento (el hamiltoniano de esta interacción) se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$\mathfrak{H} = \hat{I} \cdot \mathbf{A} \cdot \hat{S} \quad [1]$$

donde  $\hat{I}$  y  $\hat{S}$  son los operadores de espín nuclear y electrónico, respectivamente, y  $\mathbf{A}$  es el tensor de acoplamiento entre ambos<sup>100,106</sup>. Esta ecuación es válida para un electrón desapareado libre o para un ion metálico con interacción espín-órbita débil.

Dos son los mecanismos que dan origen al acoplamiento hiperfino<sup>100,106-108,223</sup>: el acoplamiento de contacto (expresado como  $A_c$ ) y el acoplamiento dipolar ( $A_{pc}$ ). El tensor  $\mathbf{A}$  es, por lo tanto, la consecuencia de estas dos contribuciones.

El acoplamiento de contacto o de Fermi se produce a través de enlaces químicos, es decir, se debe a la existencia de enlaces covalentes entre el núcleo resonante y el espín electrónico desapareado. Este acoplamiento es operativo siempre que el núcleo resonante se encuentre en una región no nula del orbital molecular con densidad electrónica desapareada. La densidad de espín desapareado interactúa con los núcleos a través de orbitales del tipo  $s$  porque son los únicos orbitales que presentan una densidad electrónica finita en el núcleo. La constante de acoplamiento de contacto,  $A_c$ , está relacionada con la densidad de espín desapareado total en el núcleo,  $\mathbf{r}$ ; mediante la siguiente ecuación<sup>100,106</sup>:

$$A_c = \frac{\mu_0}{3S} \hbar g_I g_e m_B \mathbf{r} \quad [2]$$

donde  $\mu_0$  es la permeabilidad magnética del vacío,  $\hbar$  es la constante de Plank reducida,  $g_I$  es la constante giromagnética nuclear,  $g_e$  es el parámetro de proporcionalidad entre el momento angular y el momento magnético del electrón libre (2.0023),  $m_B$  es el magnetón de Bohr y  $S$  representa el espín total del ion considerado.

El acoplamiento dipolar o de pseudocontacto proviene de la interacción a través del espacio entre los momentos magnéticos de los dipolos del núcleo resonante y de los electrones desapareados. Este acoplamiento dipolar deriva de la anisotropía del tensor de susceptibilidad

magnética,  $\mathbf{C}$ , que no se anula a pesar del movimiento rotacional de la molécula. A su vez, la susceptibilidad magnética es consecuencia de la distribución asimétrica de densidad de espín electrónico desapareado, es decir, de la anisotropía del tensor  $g$ . La magnitud del acoplamiento dipolar,  $A_{pc}$ , viene dado por<sup>108,223</sup>:

$$A_{pc} = \frac{m_0 \hbar g_I m_B}{4\pi 3 g_{av} r^3} \left\{ \left[ g_{zz}^2 - \frac{1}{2}(g_{xx}^2 + g_{yy}^2) \right] (3 \cos^2 \theta - 1) + \left[ \frac{3}{2}(g_{xx}^2 - g_{yy}^2) \sin^2 \theta \cos 2\phi \right] \right\} \quad [3]$$

donde  $r$ ,  $\theta$  y  $\phi$  son las coordenadas polares del núcleo resonante con respecto a los ejes principales del tensor  $g$ ,  $g_{kk}$  son las componentes principales de dicho tensor y  $g_{av}$  el valor medio de su traza. Las demás variables ya han sido definidas.

### 2.3. Desplazamiento Hiperfino

La primera consecuencia del acoplamiento espín desapareado-núcleo resonante es el desplazamiento hiperfino (también llamado isotrópico). El desplazamiento químico observado por un núcleo resonante,  $\mathbf{d}^{exp}$ , en un sistema con electrones desapareados es la suma de dos contribuciones<sup>106</sup>:

$$\mathbf{d}^{exp} = \mathbf{d}^{dia} + \mathbf{d}^{para} \quad [4]$$

donde  $\mathbf{d}^{dia}$  representa el desplazamiento químico que observaría dicho núcleo en la misma estructura si no existiera el centro paramagnético. El término  $\mathbf{d}^{para}$ , desplazamiento hiperfino o isotrópico, representa la contribución del acoplamiento hiperfino entre los electrones desapareados y el núcleo resonante al desplazamiento químico.

Este desplazamiento hiperfino, a su vez, puede provenir de dos tipos de interacciones diferentes en función del tipo de acoplamiento<sup>100,106</sup>:

$$\mathbf{d}^{para} = \mathbf{d}^{con} + \mathbf{d}^{pc} \quad [5]$$

donde  $\mathbf{d}^{con}$  es la contribución de contacto o de Fermi, interacción a través de enlaces químicos, y  $\mathbf{d}^{pc}$  es la contribución dipolar o de pseudocontacto, interacción a través del espacio.

#### a) *Desplazamiento de contacto*

El desplazamiento hiperfino de contacto es consecuencia de la fracción de espín electrónico desapareado que existe sobre él. Si el único estado electrónico poblado es el fundamental y no hay desdoblamiento a campo cero, el desplazamiento de contacto viene dado por<sup>61</sup>:

$$d^{con} = \frac{A_c}{\hbar} \frac{g_e m_B S(S+1)}{3g_l kT} \quad [6]$$

donde  $k$  es la constante de Boltzmann y  $T$  es la temperatura absoluta.

Cuando  $g$  es anisotrópico y diferente de  $g_e$ , el desplazamiento de contacto depende de la orientación de la molécula en el campo magnético. En disolución el desplazamiento de contacto puede ser expresado mediante la ecuación 6 si sustituimos  $g_e$  por un valor promedio,  $g_{av}$ .

La contribución de contacto se transmite mediante dos mecanismos<sup>100,223</sup>: i) por transferencia de densidad electrónica directa (deslocalización de espín); y ii) por polarización de espín.

La transferencia de densidad electrónica directa se debe a la existencia de densidad electrónica desapareada no nula en la posición del núcleo. En el orbital molecular que contiene el electrón desapareado participan también (con coeficientes no nulos) los orbitales  $s$  de los núcleos observados por RMN. La magnitud del desplazamiento hiperfino debida a este mecanismo decae drásticamente con el número de enlaces. De hecho, deja de ser, generalmente, significativo para más de cuatro enlaces. El signo de campo magnético observado por un núcleo debido a este mecanismo es siempre el mismo.

La polarización de espín se produce si el electrón desapareado se sitúa en un orbital con una probabilidad no nula de ocupar la misma región del espacio que un orbital adyacente ocupado. Cuando esto ocurre, los dos electrones de este último orbital se polarizan en sentido contrario. Esta polarización se puede transmitir, a su vez, a los electrones del orbital contiguo, los cuales ahora se polarizarán en el mismo sentido que el electrón desapareado. Los núcleos que sienten la densidad de espín electrónico desapareado ven afectado su desplazamiento químico en sentido opuesto a la polarización experimentada por los electrones. Generalmente, para enlaces consecutivos, se produce una alternancia de signo del desplazamiento de contacto observado por los núcleos.

### *b) Anisotropía magnética y desplazamiento dipolar*

Los electrones en un ion paramagnético presentan un momento angular orbital y un momento de espín. Como consecuencia, ese ion metálico posee un momento magnético orbital y un momento magnético de espín. La contribución orbital al momento magnético total depende de factores muy diversos, entre los que cabe destacar la disponibilidad de estados excitados y la constante de acoplamiento espín-órbita<sup>224</sup>. Esta constante cuantifica la magnitud del acoplamiento que se produce entre el momento magnético de espín electrónico y el momento magnético orbital. Esta contribución orbital es importante en el caso de metales de transición, y especialmente en el caso de metales de transición interna, sobre todo si existen estados energéticos excitados cercanos al fundamental de la molécula.

El momento magnético de espín electrónico se orienta siempre en la misma dirección del campo magnético externo independientemente de la dirección que adopte la macromolécula. Por el contrario, la contribución orbital adopta su propia orientación, que viene determinada por el campo de ligandos, esto es, por la molécula. Como resultado, el momento magnético electrónico total de un ion metálico depende de su orientación, y es, por lo tanto, anisotrópico. El momento magnético inducido por unidad de campo magnético, la susceptibilidad magnética (representada por el tensor  $\mathbf{C}$ ) será, por lo tanto, también anisotrópica<sup>223</sup>.

Los núcleos resonantes pertenecientes a una molécula que posee un ion paramagnético observan el momento magnético anisotrópico de dicho ion, que no se promedia en disolución. La interacción aquí considerada es de origen dipolar, es decir, se produce a través del espacio. Esta interacción influirá en (entre otros parámetros) la energía de los estados de espín nucleares ( $m_i = \pm 1/2$ ), es decir, en los desplazamientos químicos. La magnitud de la interacción observada depende de la orientación relativa entre los dos dipolos magnéticos, esto es, el del núcleo resonante y el del ion paramagnético, representado por el tensor  $\mathbf{C}$ . Cada núcleo observará un campo magnético determinado en función de su específica posición respecto al tensor de susceptibilidad magnética (Figura 4). Si suponemos que el electrón desapareado se localiza en un punto fijo del espacio, aproximación denominada *metal center*<sup>106,223</sup>, el desplazamiento químico de pseudocontacto se relaciona con el tensor de anisotropía magnética según la expresión<sup>106,223</sup>:

$$\mathbf{d}^{pc} = \frac{1}{12\pi r^3} \left[ \Delta\mathbf{C}_{ax} (3\cos^2 \mathbf{q} - 1) + \frac{3}{2} \Delta\mathbf{C}_{rh} \sin^2 \mathbf{q} \cos 2\mathbf{f} \right] \quad [7]$$

donde  $r$ ,  $\mathbf{q}$  y  $\mathbf{f}$  son las coordenadas polares de un protón relativo a los ejes principales de coordenadas del tensor  $\mathbf{C}$  (Figura 4). La importancia de esta ecuación radica en que relaciona una propiedad estructural definida por las coordenadas de los núcleos ( $r$ ,  $\mathbf{q}$  y  $\mathbf{j}$ ) con un valor observable ( $\mathbf{d}^{pc}$ ). Es necesario, no obstante, determinar la orientación de cada núcleo resonante con respecto a los ejes principales del tensor  $\mathbf{C}$  y sus componentes de anisotropía magnética,  $\Delta\chi_{ax}$  y  $\Delta\chi_{rh}$ .

Los valores de anisotropía magnética axial,  $\Delta\chi_{ax}$ , y rómbica,  $\Delta\chi_{rh}$ , vienen dados por:

$$\Delta\mathbf{C}_{ax} = \mathbf{C}_{zz} - \frac{1}{2} (\mathbf{C}_{xx} + \mathbf{C}_{yy}) \quad [8]$$

$$\Delta\mathbf{C}_{rh} = \mathbf{C}_{xx} - \mathbf{C}_{yy} \quad [9]$$

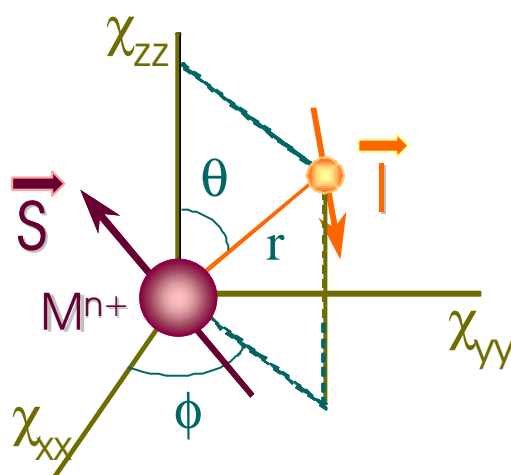
A su vez,  $\mathbf{C}_{xx}$ ,  $\mathbf{C}_{yy}$  y  $\mathbf{C}_{zz}$  son las magnitudes de las componentes principales del tensor de susceptibilidad magnética,  $\mathbf{C}$ . Si solamente está poblado el estado fundamental, y en ausencia de



desdoblamiento a campo cero (*zero-field splitting*, ZFS), estas magnitudes pueden obtenerse a partir de los valores de  $g$  a baja temperatura (4K) mediante la expresión<sup>223</sup>:

$$C_{kk} = \frac{m_0 m_B^2 S(S+1)}{3kT} g_{kk}^2 \quad [10]$$

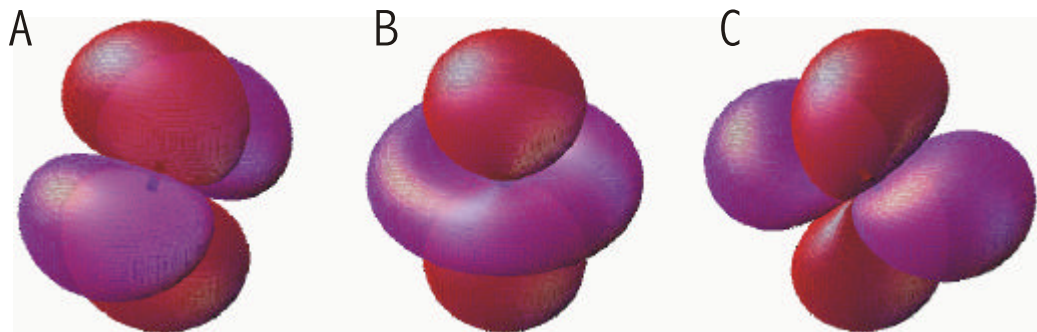
El tensor de anisotropía magnética se puede conocer si se determina el tensor  $g$ , como se ha obtenido para la azurina<sup>225,226</sup> y la plastocianina<sup>227</sup> mediante Resonancia Paramagnética Electrónica detectada con spin echo electrónico (ESE-EPR) en la banda W en monocristales. Mediante RMN también se puede determinar la orientación del tensor  $\mathbf{C}$ . Para ello se necesita un modelo estructural y un conjunto de asignaciones de protones que posean sólo contribución dipolar (pertenecientes a residuos próximos pero no coordinados al ion metálico). Si se dispone de este conjunto de señales es posible determinar la orientación del tensor y los valores de la anisotropía magnética axial y rómbica. Para ello se debe realizar un ajuste a cinco parámetros ( $\Delta\chi_{ax}$ ,  $\Delta\chi_{rh}$ ,  $r$ ,  $\mathbf{q}$  y  $\mathbf{j}$ ) entre los desplazamientos dipolares observados ( $\mathbf{d}^{exp} - \mathbf{d}^{dia}$  para los núcleos de residuos no coordinados, como se deduce de las ecuaciones 4 y 5) y los desplazamientos dipolares calculados mediante la ecuación 7. Este proceso se ha realizado con éxito en citocromos de bajo espín<sup>137,139,228,229</sup>, así como en las azurinas sustituidas con cobalto(II) y níquel(II)<sup>230</sup>.



**Figura 4.** El desplazamiento de pseudocontacto de un núcleo depende de la posición que presenta respecto al tensor de anisotropía del ion metálico (ecuación 7).

De acuerdo con la ecuación 7, núcleos situados en posiciones diferentes con relación al tensor de anisotropía magnética del ion metálico pueden presentar un mismo desplazamiento de pseudocontacto. Las regiones bidimensionales, en las que se encuentran estos núcleos, se denominan superficies de isopseudocontacto y dependen de la forma del tensor de  $\mathbf{C}$ . Para un

tensor preferentemente axial tendrán una forma que recuerda a la de un orbital  $d_{z^2}$ , mientras que para un tensor con menor simetría la forma de las superficies sería más parecida a la de orbitales  $d_{x^2-y^2}$ . En la Figura 5 se representan las superficies de isopseudocontacto para estos dos tipos de tensores.



**Figura 5.** Superficies de isopseudocontacto para tensores: A) rómbico a lo largo del eje  $x$ ; B) axial; C) rómbico a lo largo del eje  $y$ . En rojo se representan las regiones donde el desplazamiento de pseudocontacto de los núcleos será negativo y en violeta las regiones con desplazamiento de pseudocontacto positivo.

## 2.4. Velocidades de Relajación

El otro efecto resultante del acoplamiento hiperfino núcleo resonante-electrón desapareado es el incremento en las velocidades de relajación nucleares<sup>231</sup>. La relajación nuclear se debe al intercambio de energía entre los espines nucleares y el medio. La presencia de electrones desapareados proporciona una fuente de intercambio de energía adicional mucho más intensa que la debida al movimiento de la molécula en disolución o de otros mecanismos de relajación en sistemas diamagnéticos.

Podemos considerar las velocidades de relajación experimentales como la suma de dos contribuciones:

$$R_i^{\text{exp}} = R_i^{\text{dia}} + R_i^{\text{para}} \quad [11]$$

donde  $R_i^{\text{exp}}$  representa las velocidades de relajación (con  $i=1$  para la velocidad de relajación longitudinal e  $i=2$  para la transversal). Los supraíndices *dia* y *para* se refieren a las contribuciones diamagnética y paramagnética, respectivamente. A lo largo de esta Tesis utilizaremos indistintamente las velocidades de relajación nuclear  $R_1$  y  $R_2$  o sus inversas los tiempos de relajación longitudinal,  $T_1$ , y transversal,  $T_2$ .

La relajación paramagnética puede provenir de tres tipos de contribuciones diversas: de contacto ( $R_i^{con}$ ), dipolar ( $R_i^{dip}$ ) o de Curie ( $R_i^{Curie}$ ). Expresado matemáticamente:

$$R_i^{para} = R_i^{con} + R_i^{dip} + R_i^{Curie} \quad [12]$$

### a) Relajación de contacto

La contribución de contacto a los tiempos de relajación se produce a través de enlaces químicos. Viene dada por<sup>64,100,223</sup>:

$$R_1^{con} = \frac{2}{3} \left( \frac{A_c}{\hbar} \right)^2 S(S+1) \frac{t_c}{1 + (\nu_I - \nu_S)^2 t_c^2} \quad [13]$$

$$R_2^{con} = \frac{1}{3} \left( \frac{A_c}{\hbar} \right)^2 S(S+1) \left( \frac{t_c}{1 + (\nu_I - \nu_S)^2 t_c^2} + t_c \right) \quad [14]$$

donde  $\tau_c$  es el tiempo de correlación entre el núcleo y el electrón desapareado,  $\nu_I$  y  $\nu_S$  son, respectivamente, las frecuencias de resonancia del núcleo (protón, generalmente) y del electrón.

El tiempo de correlación se define como el tiempo medio que el elemento considerado (pareja espín electrónico-espín nuclear en nuestro actual caso, aunque puede referirse al momento magnético nuclear, a una pareja de espines o a una molécula) tarda en girar un radián. Se trata de una constante estadística y, de forma intuitiva, se puede relacionar con el tiempo durante el cual el campo magnético observado por el núcleo resonante, debido a su interacción con el entorno, puede ser considerado constante. Al tiempo de correlación contribuyen todos los fenómenos que varían el campo magnético observado por el núcleo. En general, éstos son: el tiempo de correlación electrónica ( $\tau_s$ ), el tiempo de correlación debido al movimiento de la molécula en disolución ( $\tau_r$ ) y la contribución de canje químico ( $\tau_M$ ). Los diferentes tiempos de correlación hacen referencia a las escalas de tiempo en las que tienen lugar los procesos dinámicos. Siempre el proceso más rápido es el de mayor influencia en el  $\tau_c$ . El tiempo de correlación total  $\tau_c$  viene dado por la suma de los recíprocos de las diversas contribuciones:

$$\tau_c^{-1} = \tau_s^{-1} + \tau_r^{-1} + \tau_M^{-1} \quad [15]$$

donde las tres contribuciones pueden ser operativas, aunque en muchos casos uno de los términos domina de modo que la contribución de los demás es despreciable. Como consecuencia de la naturaleza de la contribución hiperfina de contacto (a través de enlaces químicos, y por lo tanto independiente de la rotación molecular), ésta no se ve afectada por el movimiento rotacional de la molécula,  $\tau_r$ .

Cada una de estas contribuciones al  $\tau_c$  representa un proceso en diferentes escalas de tiempo. La velocidad de relajación electrónica,  $\tau_s$ , depende del metal y es operativa entre  $10^{-8}$  y  $10^{-14}$  s. La correlación debida a la rotación molecular,  $\tau_r$ , es operativa entre  $10^{-10}$  s (para moléculas muy pequeñas) y  $10^{-6}$  s para macromoléculas ( $PM \square 10^6$  Da). Para pequeñas proteínas ( $PM \square 10^4$  Da) el  $\tau_r$  suele ser del orden de  $10^{-8}$  s. El término  $\tau_M$  representa la contribución de canje que típicamente interviene en procesos cuya escala de tiempo es superior a  $10^{-6}$  s. No lo consideraremos aquí.

La contribución de contacto decae rápidamente con el número de enlaces y, por lo tanto, sólo es significativa en núcleos que pertenecen a residuos coordinados directamente al ion metálico. Además, debido a que las constantes de acoplamiento suelen ser pequeñas, en general, es despreciable incluso para estos núcleos.

### b) Relajación dipolar

En sistemas paramagnéticos, la contribución dipolar es el mecanismo predominante por el que se relajan los núcleos resonantes. Esta contribución es debida a la interacción a través del espacio entre los dipolos magnéticos del núcleo resonante y del espín electrónico desapareado. Si consideramos que el electrón deslocalizado se encuentra en un solo punto (aproximación *metal center*<sup>106,223</sup>), las relajaciones de origen dipolar vienen dadas por<sup>63,64</sup>:

$$R_1^{dip} = \frac{2}{15} \left( \frac{m_b}{4p} \right)^2 \frac{g_i^2 g_e^2 m_b^2 S(S+1)}{r^6} \left[ \frac{t_c}{1+(v_I - v_S)^2 t_c^2} + \frac{3t_c}{1+v_I^2 t_c^2} + \frac{6t_c}{1+(v_I + v_S)^2 t_c^2} \right] \quad [16]$$

$$R_2^{dip} = \frac{1}{15} \left( \frac{m_b}{4p} \right)^2 \frac{g_i^2 g_e^2 m_b^2 S(S+1)}{r^6} \left[ 4t_c + \frac{t_c}{1+(v_I - v_S)^2 t_c^2} + \frac{3t_c}{1+v_I^2 t_c^2} + \frac{6t_c}{1+(v_I + v_S)^2 t_c^2} + \frac{6t_c}{1+v_S^2 t_c^2} \right] \quad [17]$$

donde  $r$  es la distancia núcleo-ion metálico. La ecuación 16 es la denominada ecuación de Solomon. Esta ecuación relaciona las velocidades de relajación longitudinal con las distancias protón-núcleo. Proporciona, por tanto, información estructural (Capítulo 1 de Fundamentos Teóricos).

En estas dos expresiones, las tres contribuciones de la ecuación 15 pueden contribuir al tiempo de correlación  $\tau_c$ . Efectivamente, el tiempo de rotación de la molécula,  $\tau_r$ , es operativo en este mecanismo. Este tiempo de correlación rotacional depende del tamaño y de la forma de la molécula. En el caso de moléculas esféricas es isotrópico, y viene dado por la expresión<sup>232,233</sup>:

$$t_r = \frac{4\pi a^3}{3kT} \quad [18]$$

donde  $\eta$  es la viscosidad del medio y  $a$  es el radio de la molécula; en el caso de movimiento anisotrópico se deben considerar diferentes tiempos de correlación para los ejes principales de rotación.

### c) *Relajación de Curie*

Esta contribución es también de origen dipolar. El campo magnético externo da lugar a una distribución de Boltzman en los espines electrónicos que se orientan preferentemente a favor de dicho campo. Este exceso de población, representado por  $\langle S_z \rangle$ , produce un momento magnético. La interacción de este momento magnético inducido y el momento magnético del núcleo origina una relajación adicional denominada relajación de Curie, que viene dada por la expresión<sup>106,223</sup>:

$$R_2^{Curie} = \frac{1}{5} \left( \frac{m_b}{4p} \right)^2 \frac{v_l^2 g_e^4 m_B^4 S^2 (S+1)^2}{(3kT)^2 r^6} \left[ 4t_c + \frac{3t_c}{1+v_l^2 t_c^2} \right] \quad [19]$$

El desdoblamiento energético que origina este acoplamiento de origen dipolar es pequeño, porque la magnitud del momento magnético inducido es también pequeña. No obstante, esta contribución aumenta con el cuadrado del campo magnético. Así, este efecto será muy importante para núcleos con  $S > 1/2$  en campos magnéticos altos, por lo que el uso de este tipo de espectrómetros no es aconsejable en estos sistemas (las señales son excesivamente anchas y pueden llegar a no observarse). Por el contrario, en sistemas con  $S = 1/2$ , como el ion cobre(II), este efecto no es tan radical. De hecho, en estos sistemas, como en los sistemas diamagnéticos, cuanto mayor es el campo, mayor es la intensidad de las señales.

La relajación de Curie es prácticamente despreciable sobre la relajación longitudinal, sin embargo, suele tener un efecto determinante sobre el  $R_2$  debido al término no dispersivo en la función (término  $4t_c$  en ecuación 19).

## **2.5. Iones Metálicos Adecuados para RMN**

Una señal de un espectro de RMN (intensidad frente a frecuencia) consiste en la transformada de Fourier de la respuesta de radiación del núcleo observado. Como la señal se adquiere siempre en el plano  $xy$ , la señal decae de acuerdo al  $T_2$  del núcleo. Dicho de otra forma:

$$(T_2^{-1})^{exp} = p \Delta n_{1/2} \quad [20]$$

donde  $\Delta v_{1/2}$  representa la anchura de la señal a altura mitad. Es evidente que cuanto más estrecha sea una señal tanto mejor se diferenciará del ruido de fondo, es decir, tanto mejor se observará. En el límite una señal extremadamente ancha se confundirá con la línea base del espectro. Teniendo en cuenta lo anterior, es inmediato deducir, mediante la ecuación 20, que cuanto menor es la velocidad de relajación transversal de una señal, tanto más fácil es su observación.

Por lo dicho en el apartado precedente, en sistemas paramagnéticos la velocidad de relajación transversal de un núcleo aumenta en gran medida por la interacción con los electrones desapareados. Éste es, sin lugar a dudas, el principal inconveniente que, como también hemos comentado en el apartado 1.3, producía el recelo de los espectroscopistas a estudiar mediante RMN moléculas con electrones desapareados.

No es éste el único problema. En efecto, en los experimentos bidimensionales, la magnitud de la interacción de los acoplamientos (los picos de cruce de un 2D) es proporcional al tiempo en que los dos núcleos están acoplados. Si los tiempos durante los que se pueden acoplar los núcleos son muy cortos, evidentemente los picos de cruce serán muy poco intensos o, incluso, no se observarán. En los experimentos en los que los picos de cruce son consecuencia de acoplamientos dipolares, el tiempo durante el cual se acoplan los núcleos depende del tiempo de relajación longitudinal<sup>15</sup>. Si este tiempo es muy corto, se reducirá la magnitud de los acoplamientos. Así mismo, en los experimentos tipo COSY y derivados (en los que se observa el acoplamiento escalar) el tiempo de acoplamiento depende de  $J_{IJ}$ . En sistemas paramagnéticos, con tiempos  $T_1$  y  $T_2$  muy cortos, los picos de cruce son, en todos los experimentos bidimensionales, mucho más débiles que en sistemas diamagnéticos análogos<sup>107,234</sup>. Esto nos indica que, aún en el caso de que se observen las señales, su asignación será francamente difícil. Y un espectro de RMN sin asignar es, todavía hoy, un libro con palabras sueltas. Pero se intenta que esta situación cambie en el futuro.

En un sistema paramagnético, los tres sumandos de la ecuación 15 pueden ser, en principio, operativos. Los tiempos de correlación electrónicos varían entre  $10^{-8}$  y  $10^{-14}$  s en función del ion metálico (ver más adelante). El canje químico,  $\tau_M$  (cuando se produce), tiene lugar en escalas de tiempo superiores a los microsegundos. Por último, los tiempos rotacionales de las moléculas dependen de su peso molecular (o de su volumen, ecuación 18). En proteínas de masa molecular moderada (10-100 kDa), el  $\tau_r$  es del orden de  $10^{-9}$ - $10^{-7}$  s. Para iones metálicos que cumplan que  $\tau_s \ll \tau_r$  (la gran mayoría), la velocidad de relajación electrónica será la que regule las velocidades de relajación de los núcleos resonantes. Por lo tanto, las velocidades de relajación de los núcleos serán dependientes de las ecuaciones previamente descritas (ecuaciones 16, 17 y 19). Por otra parte, cuando los tiempos de relajación electrónica sean muy pequeños en comparación con los tiempos de rotación, la interacción espín electrónico-núcleo resonante será muy efectiva y, en consecuencia, los núcleos sentirán el efecto neto de un electrón desapareado. Si la velocidad de relajación electrónica es muy alta, el núcleo observa un promedio de esta relajación electrónica y el efecto neto será menor. Por lo tanto, cuanto menor sea el tiempo de correlación electrónica de un

metal, tanto menor será su efecto en los núcleos cercanos, lo que, a su vez, producirá señales relativamente estrechas y fáciles de observar (velocidades de relajación nuclear relativamente pequeñas). La inversa también es cierta. Iones metálicos cuya relajación electrónica es poco efectiva (del orden o superiores al  $\tau_r$  de la molécula) producirán un gran aumento en las velocidades de relajación nucleares, produciendo el ensanchamiento de las señales de RMN<sup>100,106</sup>.

A su vez, las velocidades de relajación electrónicas están determinadas por la estructura electrónica del ion metálico y, por lo tanto, por la naturaleza de éste, por su estado de oxidación, por los átomos dadores y por su geometría de coordinación. En general, si el estado fundamental de un ion metálico está bastante alejado energéticamente de otros estados excitados y no presenta acoplamiento espín-órbita, entonces su relajación es lenta y, por lo tanto, ese ion metálico, en esa geometría de coordinación, no será óptimo para RMN. Por el contrario, si existen estados electrónicos próximos al fundamental, la relajación electrónica del ion metálico es más eficiente y, por consiguiente, los núcleos acoplados a él sentirán un efecto menor y tendrán tiempos de relajación no excesivamente cortos. En este caso, estos iones serán adecuados para RMN.

Por último, hemos de destacar que el aumento de las velocidades de relajación por el efecto paramagnético (ecuaciones 16 y 17) depende del cuadrado de la razón giromagnética del núcleo resonante. Por lo tanto, es crítica en el caso del protón, menos acusada para el carbono-13 y mucho menos eficiente en el caso del nitrógeno-15. A continuación comentamos qué iones metálicos son idóneos para la adquisición de espectros de RMN de protón, en función de las características descritas. Como quiera que el origen del paramagnetismo es diferente entre los iones de transición y los de transición interna, hemos clasificado los iones metálicos de acuerdo con este criterio.

### *a) Iones de la serie d*

El paramagnetismo de los iones metálicos de las series *d* depende exclusivamente de  $S$ , y no de  $L$ <sup>235,236</sup>. En estos casos, para cada ion metálico, la relajación electrónica,  $\tau_s$ , vendrá determinada por la geometría de coordinación. En la Tabla 1 se presentan los  $\tau_s$  de algunos iones de la serie *d*, así como las anchuras de banda que presentan los protones situados a 5 Å del metal en presencia de un campo de 11.7 T (500 MHz). Se suele considerar un valor de  $10^{-11}$  s como el  $\tau_s$  límite por debajo del cuál es posible realizar RMN de alta resolución<sup>237</sup>.

**Tabla 1.** Valores de  $\tau_s$  para diversos iones paramagnéticos de las series de transición. Se indican, así mismo, las velocidades de relajación nuclear que inducen en protones situados a 5 Å en un campo de 11.7 T, 298 K, de acuerdo con las ecuaciones 16 y 17<sup>237</sup>.

Ion Metálico	S	$t_s$ (s)	Moléculas pequeñas		Moléculas grandes	
			( $\tau_r=10^{-10}$ s) $R_{1,2M}$ (s <sup>-1</sup> )	( $\tau_r=10^{-8}$ s) $R_{1M}$ (s <sup>-1</sup> ) $R_{2M}$ (s <sup>-1</sup> )		
Ti <sup>3+</sup>	½	10 <sup>-10</sup> -10 <sup>-11</sup>	40-300	40-400	100-500	
VO <sup>2+</sup>	½	10 <sup>-8</sup>	300-500	30	15000	
V <sup>3+</sup>	1	10 <sup>-11</sup>	100-150	100	500	
V <sup>2+</sup>	3/2	10 <sup>-9</sup>	1500-2000	1000	15000	
Cr <sup>3+</sup>	3/2	5×10 <sup>-9</sup> -5×10 <sup>-10</sup>	1500-2000	200-1500	1×10 <sup>4</sup> -6×10 <sup>4</sup>	
Cr <sup>2+</sup>	2	10 <sup>-11</sup> -10 <sup>-12</sup>	50-500	40-400	4000	
Mn <sup>3+</sup>	2	10 <sup>-10</sup> -10 <sup>-11</sup>	300-2000	300-3000	4000-8000	
Mn <sup>2+</sup>	5/2	10 <sup>-8</sup>	4000-6000	400	200000	
Fe <sup>3+</sup> (a.s.) <sup>b</sup>	5/2	10 <sup>-9</sup> -10 <sup>-11</sup>	500-6000	500-3000	8000-5×10 <sup>4</sup>	
Fe <sup>3+</sup> (b.s.) <sup>c</sup>	½	10 <sup>-11</sup> -10 <sup>-13</sup>	2-50	1-60	50-150	
Fe <sup>2+</sup> (a.s.) <sup>b</sup>	2	10 <sup>-12</sup> -10 <sup>-13</sup>	50-150	10-50	4000	
Co <sup>2+</sup> (a.s. <sup>b</sup> , 5-6 <sub>coord</sub> ) <sup>d</sup>	3/2	5×10 <sup>-12</sup> -10 <sup>-13</sup>	20-200	10-200	1000-2000	
Co <sup>2+</sup> (a.s. <sup>b</sup> , 4 <sub>coord</sub> )	3/2	10 <sup>-11</sup>	200-300	200-400	500-3000	
Co <sup>2+</sup> (b.s.) <sup>c</sup>	½	10 <sup>-9</sup> -10 <sup>-10</sup>	200-400	200-400	500-3000	
Ni <sup>2+</sup> (5-6 <sub>coord</sub> ) <sup>d</sup>	1	10 <sup>-10</sup>	600-700	1000	2000	
Ni <sup>2+</sup> (4 <sub>coord</sub> )	1	10 <sup>-12</sup>	20-30	20	400	
Cu <sup>2+</sup>	½	10 <sup>-8</sup> -10 <sup>-10</sup>	300-500	40-200	3000-2×10 <sup>5</sup>	
Ru <sup>3+</sup>	½	10 <sup>-11</sup> -10 <sup>-12</sup>	5-50	5-50	50-150	
Re <sup>3+</sup>	2	10 <sup>-12</sup> -10 <sup>-13</sup>	50-150	10-50	4000	

<sup>a</sup>En el límite de movimiento rápido (para moléculas de peso molecular inferior a 2000 Da en disolución acuosa a temperatura estándar), el término dispersivo  $4\tau_c$  de la ecuación 17 es despreciable y, como consecuencia,  $R_1$  y  $R_2$  coinciden. <sup>b</sup>alto espín. <sup>c</sup>bajo espín. <sup>d</sup>el subíndice "coord" se refiere al número de coordinación del ion metálico.



A la vista de esta Tabla, los iones adecuados para el estudio de sistemas biológicos mediante RMN de paramagnéticos son: el hierro(III) de bajo espín, el níquel(II) tetraédrico, el cobalto(II) de alto espín hexacoordinado y el renio(III). El cobalto(II) de bajo espín y el hierro(III) de alto espín se encontrarían en el límite de sistemas aceptables para su aplicación en RMN de paramagnéticos. El oxovanadio(IV), el cromo(III), el cobre(II) y el manganeso(II) no son adecuados.

Comentamos aquí las propiedades electrónicas de los iones metálicos que hemos utilizado en la presente Tesis. El cobre(II) relaja lentamente, con valores de  $\tau_s$  entre  $10^{-8}$  y  $10^{-10}$  s. Esta velocidad de relajación, pequeña comparada con otros iones metálicos, es consecuencia de la baja contribución orbital al momento electrónico y de la alta energía de los estados excitados<sup>106</sup>. En efecto, el ion Cu(II) no presenta desdoblamiento a campo cero (*zero-field splitting*, ZFS) y la anisotropía magnética es muy pequeña. Por lo tanto, los protones próximos a un centro de cobre(II) tienen un acoplamiento muy efectivo con el electrón desapareado y, en consecuencia, las velocidades de relajación nucleares serán muy altas (Tabla 1). Por este motivo el cobre(II) es un “mal” núcleo para su estudio mediante la metodología de RMN de paramagnéticos.

Una excepción a esta “regla” sería la que produce el cobre(II) en sistemas acoplados. En efecto, en sistemas en donde el cobre(II) se acopla magnéticamente a otro ion metálico, la relajación se hace más efectiva, aumenta la velocidad de relajación electrónica y los núcleos acoplados a estos iones son observables mediante RMN. Buen ejemplo de esto son la superóxido dismutasa de cobre y cobalto, CuCoSOD<sup>133,238</sup> y los sistemas que contienen un centro de Cu<sub>A</sub><sup>239-242</sup> (apartado 3.1).

En las BCPs, donde el cobre está fuertemente coordinado a un átomo de azufre de un ligando cisteína y posee esencialmente una geometría tetraédrica, sus estados excitados están más próximos (en términos energéticos) al fundamental que en complejos inorgánicos típicos. En consecuencia, el electrón relaja más rápidamente y los tiempos de correlación son menores de  $10^{-9}$  s<sup>243,244</sup>. Dicho con otras palabras, las BCPs son, de entre las proteínas que contienen cobre(II), los sistemas menos desfavorables para ser estudiados por RMN de paramagnéticos. En cualquier caso, incluso en las BCPs, estamos hablando de sistemas, en principio, no adecuados para su estudio mediante RMN de protón. En efecto, como se describe en la presente Tesis, sus señales son difícilmente observables (si es que se llegan a observar) y en ningún caso asignables mediante la metodología clásica.

El cobalto(II), un ion  $d^7$ , presenta propiedades electrónicas muy directamente dependientes de su geometría. Un ion cobalto(II) de simetría octaédrica o próxima a ella (nos referiremos siempre a un ion  $d^7$  de alto espín) presenta un estado fundamental  $^4T_{1g}$ . Este triplete se convierte en seis dobletes de Kramer si se tiene en cuenta el acoplamiento espín-órbita. En consecuencia, existen niveles electrónicos próximos al fundamental que facilitan la relajación electrónica, ésta es muy efectiva (del orden de  $10^{-12}$  s) y las señales de RMN de protón producidas en este tipo de sistemas son suficientemente estrechas para ser observadas<sup>106,172</sup>. En el otro extremo, un complejo tetraédrico de cobalto(II) posee un estado fundamental  $^4A_2$ . En este estado no degenerado

orbitalmente, la relajación electrónica es menos efectiva ( $\tau_s$  del orden de  $10^{-10}$  s) y los núcleos acoplados a este ion producen señales de RMN anchas. No obstante, si el sistema se desvía de esta geometría tetraédrica y/o la diferente naturaleza de los átomos dadores reducen esta alta simetría, entonces la relajación electrónica es más efectiva y las señales de RMN se observarán<sup>106,172</sup>. Ésta es la situación que presentan las proteínas azules de cobre sustituidas por cobalto(II)<sup>189,191,192,195,197,230,245,246</sup>. En efecto, aunque la geometría del ion metálico en estas proteínas es próxima a la tetraédrica, el metal (como se discute en el siguiente Capítulo de esta Introducción) se encuentra en un entorno asimétrico, coordinado muy fuertemente a un azufre de una cisteína, algo más débilmente a dos nitrógenos imidazólicos y débilmente a una metionina axial<sup>247</sup>. Esta geometría altamente distorsionada produce, en Co(II)BCPs, un ZFS que facilita la relajación electrónica. Las señales de RMN en estos sistemas son, como mostramos en los Capítulos 1 y 3 de Resultados, suficientemente estrechas como para ser observadas y asignadas mediante la metodología de RMN de paramagnéticos.

Otra característica esencial de los sistemas de cobalto(II) de alto espín para su estudio en RMN es su alta anisotropía magnética (apartado 2.3), relacionada con la distribución asimétrica de espín electrónico desapareado. Como consecuencia de esta anisotropía magnética, los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de las BCPs sustituidas con cobalto(II) poseen una gran dispersión de sus señales. Así, mediante la sustitución de Cu(II) por Co(II) obtenemos información no sólo de los ligandos del metal sino también de los residuos cercanos al mismo<sup>230,246</sup>.

### b) Iones de la serie *f*

Las propiedades electrónicas de los lantánidos son especiales ya que las interacciones espín-órbita son muy grandes, superiores incluso a los efectos del campo de los ligandos<sup>235,236</sup>. El ZFS no es (como en el caso de los iones *d*) una pequeña modificación de los niveles energéticos que se pueda tratar como una perturbación adicional al campo creado por los ligandos, sino que, al contrario, es la principal fuente de desdoblamiento de los niveles energéticos del ion metálico y, en consecuencia, de su paramagnetismo<sup>236</sup>. Las propiedades magnéticas de estos núcleos sólo se pueden explicar teniendo en cuenta conjuntamente tanto el momento angular de espín electrónico,  $S$ , como el momento angular orbital,  $L$ , acoplado al primero. Los términos de los iones libres están caracterizados, pues, por los valores de  $J$ , combinación vectorial de  $S$  y  $L$ .

En 1972 Bleaney<sup>206</sup> propuso un procedimiento para explicar los parámetros de RMN (desplazamiento hiperfino y relajación nuclear) encontrados en los protones en estos sistemas. Según esta aproximación, el desplazamiento de pseudocontacto en sistemas en los que se encuentren presentes los iones lantánidos viene dado por:

$$d^{pc} = -\frac{m_l g_l m_B J(J+1)(2J-1)(2J+3)}{4p \cdot 60(kT)^2} \frac{D_z (3\cos^2 q - 1) + (D_x - D_y) \sin^2 q \cos 2f}{r^3} \quad [21]$$

donde  $r$ ,  $q$  y  $f$  son las coordenadas polares del núcleo resonante relativo a las direcciones principales del tensor de desdoblamiento de campo cero para el ion metálico,  $D$ , y  $g_J$  viene dado por:

$$g_J = 1 + \frac{J(J+1) - L(L+1) + S(S+1)}{2J(J+1)} \quad [22]$$

La ecuación 21 es análoga a la ecuación 7, aunque aquí, conocida la configuración electrónica del ion lantánido, es posible calcular el desplazamiento de pseudocontacto de los núcleos del sistema. En definitiva, esta ecuación refleja (como lo hace la ecuación 7 en el caso de los iones de las series  $d$ ) la dependencia entre el desplazamiento dipolar con la anisotropía magnética. La validez de la ecuación 21 se ha comprobado, en gran medida, en diversos sistemas que contienen iones lantánidos<sup>248,249</sup>.

Así mismo, en estos sistemas, también se ha constatado que las velocidades de relajación de los protones son proporcionales a la anisotropía magnética del ion lantánido, es decir, siguen la misma tendencia con respecto al valor de  $J$  que la derivada de esta ecuación<sup>248</sup>. En la Tabla 2 se muestran los valores correspondientes a los tiempos de relajación electrónicos para estos lantánidos, así como anchuras espectrales observadas por protones a 5 Å del ion metálico en un campo de 18.8 T (800 MHz)<sup>237</sup>.

Según se observa en la Tabla el  $Ce^{3+}$  es el lantánido más adecuado para la observación de señales mediante RMN. El  $Pr^{3+}$ ,  $Nd^{3+}$  y, en menor medida, el  $Yb^{3+}$  son también aceptables como sondas espectroscópicas aunque, debido al mayor ensanchamiento que causan en las señales ( $R_2$  entre 1000 y 3000  $s^{-1}$ ), su efecto es muy acusado sobre todo en núcleos muy cercanos al metal. Otros iones como el  $Tb^{3+}$ ,  $Dy^{3+}$ ,  $Ho^{3+}$  y  $Tm^{3+}$  incrementan las velocidades de relajación en un orden de magnitud. Estos iones tienen un alcance muy superior a los anteriores. Por lo tanto, en estos sistemas sólo se observarán señales correspondientes a núcleos situados a distancias relativamente lejanas del ion metálico (apartado 4.4). El  $Sm^{3+}$  posee un grado de paramagnetismo muy pequeño, por lo que, a efectos prácticos, casi podría considerarse como un ion metálico diamagnético. Por último, en el otro extremo se encuentra el gadolinio cuyo paramagnetismo proviene exclusivamente de sus siete electrones desapareados ( $\ell=0$ ). Esta propiedad del  $Gd^{3+}$  para incrementar extraordinariamente las velocidades de relajación longitudinal de los núcleos ha hecho de él un núcleo idóneo como agente de contraste en Resonancia Magnética de Imagen, MRI<sup>250</sup>.

**Tabla 2.** Valores de  $\tau_s$  para los iones lantánidos trivalentes y velocidades de relajación nuclear que producen en protones situados a 5 Å del ion metálico en un campo de 18.8 T a 298 K<sup>237</sup>.

<i>Ion Lantánido</i>	<i>J</i>	<i>t<sub>s</sub> (s)</i>	<i>Moléculas pequeñas</i>		<i>Moléculas grandes</i>	
			$(\tau_r=10^{-10} \text{ s})$ <i>R<sub>1,2M</sub> (s<sup>-1</sup>)</i>	$(\tau_r=10^{-8} \text{ s})$ <i>R<sub>1M</sub> (s<sup>-1</sup>)</i>	<i>R<sub>2M</sub> (s<sup>-1</sup>)</i>	
Ce <sup>3+</sup>	5/2	10 <sup>-13</sup>	7-8	4	300	
Pr <sup>3+</sup>	4	3×10 <sup>-13</sup> -6×10 <sup>-14</sup>	16-30	5-13	1000	
Nd <sup>3+</sup>	9/2	2· 10 <sup>-13</sup>	20-30	10	1100	
Pm <sup>3+, a</sup>	4	-	-	-	-	
Sm <sup>3+</sup>	5/2	2×10 <sup>-13</sup> -5×10 <sup>-14</sup>	0.2-0.6	0.2-0.5	3-4	
Eu <sup>3+, b</sup>	0	-	-	-	-	
Gd <sup>3+</sup>	7/2	10 <sup>-8</sup> -10 <sup>-9</sup>	5000-15000	800-5000	1×10 <sup>5</sup> -4×10 <sup>5</sup>	
Tb <sup>3+</sup>	6	2×10 <sup>-13</sup>	800-1000	120	60000	
Dy <sup>3+</sup>	15/2	1×10 <sup>-12</sup> -4×10 <sup>-13</sup>	1100-1500	170-300	80000	
Ho <sup>3+</sup>	8	8×10 <sup>-13</sup> -2×10 <sup>-14</sup>	1100-1500	150-200	80000	
Er <sup>3+</sup>	15/2	8×10 <sup>-13</sup> -3×10 <sup>-14</sup>	700-1000	120-200	50000	
Tm <sup>3+</sup>	6	5×10 <sup>-13</sup>	300-400	80	20000	
Yb <sup>3+</sup>	7/2	5×10 <sup>-13</sup> -2×10 <sup>-14</sup>	50-70	16-30	3000	

<sup>a</sup>Pm<sup>3+</sup> es radiactivo. <sup>b</sup>Eu<sup>3+</sup> es diamagnético, por lo que no incluimos los restantes datos; no obstante, el paramagnetismo en este sistema proviene de estados excitados electrónicos (con  $J \neq 0$ ) que están parcialmente poblados a temperatura ambiente<sup>206</sup>.

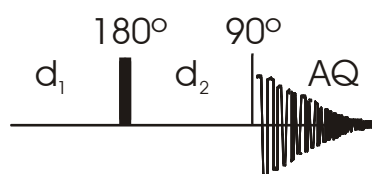
## 2.6. Experimentos Básicos en la RMN de Sistemas Paramagnéticos

La modificación de los parámetros de RMN de los núcleos resonantes, debida a la presencia de iones paramagnéticos en una molécula, ha hecho necesario el desarrollo de secuencias de pulsos especiales para la detección de estos núcleos o la adecuación de las ya existentes para sistemas

diamagnéticos. A continuación comentamos someramente las secuencias y tipo de experimentos más relevantes en la obtención de espectros RMN en un sistema paramagnético.

### a) Secuencia *superweft*

Para la detección de señales de  $^1\text{H}$  en un sistema paramagnético, la secuencia más eficaz es la denominada *superweft*<sup>251</sup>. Esta secuencia se muestra en la Figura 6.



**Figura 6.** Secuencia de pulsos *superweft*<sup>251</sup>.

En esta secuencia, existen dos tiempos inter-pulsos ( $AQ + d_1$ , por un lado, y  $d_2$ , por otro). Si estos dos tiempos se eligen muy pequeños (del orden de decenas de milisegundos) comparados con el tiempo de relajación longitudinal de una señal diamagnética y si al  $d_2$  se le asigna, aproximadamente, el 80 % del valor del tiempo  $AQ + d_1$ , las señales diamagnéticas se saturan, mientras que las paramagnéticas (que tienen un  $T_1$  muy inferior a cualquiera de estos dos tiempos) mantienen prácticamente su total intensidad. En la práctica el tiempo  $d_2$  se obtiene experimentalmente buscando un valor que anule la señal diamagnética. Si el tiempo  $d_2$  es lo suficientemente corto, las señales diamagnéticas, entre ellas el agua, prácticamente desaparecen. Es muy importante que el pulso utilizado sea lo más corto posible, ya que, de no ser así, señales muy alejadas de la frecuencia portadora observan un pulso muy diferente a  $90^\circ$  ó  $180^\circ$ , disminuyendo su intensidad.

La idea de la secuencia *superweft* se ha aplicado también a experimentos 2D. Los experimentos WEFT-NOESY y WEFT-TOCSY<sup>252</sup> consisten en la secuencia de pulsos NOESY o TOCSY, precedidos de un pulso de  $180^\circ$  y un tiempo  $d_2$ . Si se conjugan adecuadamente los tiempos de reciclo y este tiempo  $d_2$ , las señales de relajación lenta se saturan, obteniendo un bidimensional en donde los picos de cruce son exclusivos de las señales que relajan rápidamente. Nosotros, basándonos en el mismo concepto, hemos ideado un tren de pulsos (al que hemos denominado *inv-superweft*) que permite filtrar señales paramagnéticas de acuerdo con el  $T_1$  (Capítulo 1 de Resultados).

### b) Experimento NOE

El efecto nuclear Overhauser<sup>15,253</sup> es, sin lugar a dudas, el experimento que mayor información proporciona en RMN. Gracias a él se obtienen distancias interatómicas y, aunque otros efectos y/o parámetros de RMN también proporcionan información estructural, todas las estructuras

de biomoléculas hasta ahora resueltas se basan en él. El experimento más útil para la asignación de señales muy paramagnéticas es el efecto Nuclear Overhauser en su versión de “estado estacionario” (*steady state* 1D NOE)<sup>15,253</sup>. En este tipo de experimentos, la intensidad del NOE observado depende del  $T_1$  de la señal que da NOE, no de la irradiada. Por este motivo, en sistemas paramagnéticos, siempre se satura la señal que relaja rápidamente y se observa si existe respuesta o no en otras señales más alejadas del ion metálico. Se aprovecha el tiempo de relajación más largo de señales relativamente lejanas del centro paramagnético y, por lo tanto, más diamagnéticas. El fenómeno de difusión de espín es muy útil en sistemas paramagnéticos para reconocer ciertos patrones de espín y, consiguientemente, la asignación de las señales.

### c) Espectroscopía de intercambio

Los experimentos tipo NOE (en sus variantes 1D o en su variante 2D) pueden proporcionar información no sólo sobre núcleos próximos entre sí (acoplamiento dipolares) sino también sobre un mismo núcleo que se encuentra en dos entornos diferentes. Estos dos entornos producen desplazamientos químicos diferentes. Si la velocidad de intercambio es apropiada es posible observar una correlación entre las dos señales en un espectro NOE. Ésta es la denominada “espectroscopía de intercambio” (en la variante 2D la denominada *EXchange Spectroscopy*, EXSY). Esta espectroscopía se utilizaba ya en los años 80 para la asignación de citocromos de Fe(III) de bajo espín<sup>127,129</sup>. Estos citocromos son paramagnéticos en su estado oxidado y diamagnéticos en su estado reducido. Los protones próximos al centro metálico aparecen claramente desplazados del entorno diamagnético. Si la velocidad de transferencia de intercambio entre las especies oxidada y reducida (es decir, la velocidad de transferencia electrónica) es adecuada, entonces es posible una respuesta entre estas dos señales en un experimento NOE. Más aún, la intensidad de estas señales depende de la velocidad de transferencia y de la diferencia entre los desplazamientos químicos<sup>108</sup>, por lo que se pueden obtener respuestas mayores incluso que las señales irradiadas (en experimentos NOESY los picos de cruce pueden ser incluso mayores que los picos de la diagonal)<sup>157</sup>. Esto nunca sucede en los verdaderos NOEs (acoplamiento dipolares) en donde existe un límite teórico máximo del NOE observado, que es, siempre, en sistemas paramagnéticos, una fracción muy pequeña de la intensidad de las señales de partida<sup>133</sup>. Esta metodología ha sido también ampliamente usada en proteínas hierro azufre, tanto en ferredoxinas “clásicas”<sup>107,131,254,255</sup> como en las HiPIP<sup>154-156,163,256</sup>.

Un paso más en la asignación de señales fue “asignar sin ver”, los denominados NOEs ciegos (*blind NOEs*)<sup>199</sup>. Este método también está basado en la espectroscopía de intercambio y se explica detalladamente en el apartado 3.4 de esta Introducción.

## 3. Proteínas Azules de Cobre: Rusticianina

### 3.1. El Cobre en Sistemas Biológicos

El cobre es el metal de transición más abundante en la naturaleza después del hierro<sup>257</sup>. En los sistemas vivos se puede encontrar en dos estados de oxidación: Cu(I) y Cu(II). Este par redox se puede adaptar al intervalo de potenciales redox biológicos.

El cobre se encuentra en una gran variedad de proteínas con funciones muy diversas<sup>236,257,258</sup>, entre las que podemos destacar: reacciones de transferencia electrónica, transporte de oxígeno, catálisis, proceso de sinapsis... Las proteínas de cobre se han clasificado tradicionalmente en tres grupos en función de sus propiedades espectroscópicas<sup>259</sup>:

- **Proteínas de Cobre Tipo 1 o Proteínas Azules de Cobre:** El nombre de proteínas azules de cobre, BCPs, viene dado por la característica coloración azul que presentan estas metaloproteínas en su estado oxidado. En efecto, en el espectro electrónico aparece una banda a 600 nm muy intensa ( $\epsilon \approx 2000-5000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ), debida a una transición de transferencia de carga ligando-metal (LMCT) entre uno de los ligandos del metal, concretamente un residuo de cisteína, y el centro de cobre(II)<sup>260,261</sup>. Estas proteínas se caracterizan también por poseer una constante de acoplamiento hiperfino paralelo,  $A_{\parallel}$ , pequeña ( $\approx 100 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ) en su espectro de EPR. Esto indica una disminución en la interacción entre el espín electrónico y el espín nuclear del ion cobre(II), debida, a su vez, a una fuerte deslocalización del electrón desapareado.

La geometría del centro activo en las BCPs es tetraédrica distorsionada o trigonal distorsionada y los átomos dadores son de nitrógeno, de azufre y/o de oxígeno<sup>247</sup>. Este tipo de centro se puede encontrar, no sólo en proteínas azules de cobre, sino también en nitrito reductasas (NiR) de cobre y en oxidasas azules<sup>103</sup>.

La función biológica de estas proteínas es la transferencia electrónica<sup>261</sup>.

- **Proteínas de Cobre Tipo 2:** Los centros de cobre Tipo 2 se suelen denominar “cobre incoloro” porque su banda de absorción en la zona del visible es mucho menos intensa que las de otros cromóforos de cobre<sup>262</sup>. Sus propiedades espectroscópicas son análogas a las de los pequeños complejos inorgánicos de este ion. Por este motivo estas metaloproteínas se denominan también de “cobre normal”. De hecho, el espectro electrónico en la zona del visible proviene de transiciones *d-d* del ion metálico. El espectro de EPR de un centro Tipo 2 es similar al de los complejos de cobre(II) simples, esto es, axial, y el valor de  $A_{\parallel}$  oscila entre  $(140-200) \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ .

La geometría de este tipo de cobre suele ser tetraédrica distorsionada y sus átomos dadores típicos son nitrógeno y oxígeno<sup>247</sup>.

Este centro se encuentra en las oxidasas no azules de cobre como, por ejemplo, la galactosa oxidasa<sup>263</sup> y la amino oxidasa<sup>264</sup>; en monoxigenasas como la dopamina  $\beta$ -monoxigenasa; en la Cu,Zn-superóxido dismutasa<sup>265</sup>; en alguna metano mono-oxigenasa<sup>103</sup>. Estas proteínas actúan en procesos de catálisis.

También hay un centro de estas características en la proteína *prion*<sup>266-268</sup> causante de, entre otras, la encefalopatía espongiforme bovina y el denominado *scrapie* o tembladera en animales o las distintas variantes de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, el insomnio fatal y el kuru en humanos<sup>269,270</sup>. El péptido A $\beta$ -amiloide, causante en último término de la enfermedad de Alzheimer, también une cobre de este tipo<sup>271,272</sup>. Se cree que precisamente la unión de cobre produce o acelera la formación de amiloides, que dan lugar a la formación de placas seniles<sup>273,274</sup>.

- **Proteínas de Cobre Tipo 3:** Estas proteínas presentan un sitio binuclear de cobre(II) con acoplamiento antiferromagnético. Debido a ello, el cobre(II) Tipo 3 tiene un comportamiento diamagnético a temperatura ambiente y es silencioso a la EPR. En el espectro UV-Vis se observa una banda de absorción centrada en torno a los 330 nm, con coeficientes de extinción molar de  $(3-5) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , debida a una transición de transferencia de carga.

La geometría de coordinación de estos sitios binucleares es trigonal plana y los átomos dadores suelen ser nitrógenos para los dos átomos.

Un ejemplo de proteínas con centro de Tipo 3 lo constituye la hemocianina<sup>275</sup> cuya función es el transporte de dioxígeno. También se encuentran estos centros de cobre en oxigenasas como la tirosinasa<sup>276,277</sup> o en oxidasas azules cuya función es catalítica<sup>278-280</sup>.

Estas tres categorías constituyen la clasificación tradicional establecida por Malmström<sup>281</sup> basándose en las propiedades espectroscópicas observadas. Posteriormente se ha evidenciado que esta clasificación era insuficiente y se ha ampliado para incluir otros tipos de centros:



- **Proteínas de Cobre Tipo 4:** El centro trinuclear de cobre está formado por dos centros de cobre, uno de Tipo 2 y otro de Tipo 3, que se encuentran muy próximos entre sí formando un cluster trinuclear que funciona como una única unidad en la reducción multielectrónica del dióxigeno a agua.

El centro de cobre Tipo 4 se encuentra en las oxidasas azules de cobre como lacasa, ascorbato oxidasa y ceruloplasmina<sup>282,283</sup>, las cuales presentan además uno o más centros de cobre Tipo 1.

- **Centro de Cu<sub>A</sub>:** Es un centro binuclear de cobre de valencia mixta [Cu(1.5),Cu(1.5)]/[Cu(1),Cu(1)]<sup>241,265,284</sup>, donde la corta distancia entre ambos átomos de cobre, 2.5 Å, implica enlace metal-metal. Las características estructurales y espectroscópicas del centro metálico son muy similares a las del cobre Tipo 3, lo cual hace pensar en la existencia de una proteína ancestral común<sup>275</sup>.

La geometría de coordinación del centro binuclear es tetraédrica distorsionada o trigonal plana. Los átomos coordinados a los iones metálicos son nitrógenos, azufres y oxígenos.

Presenta dos bandas de LMCT a 480 y 530 nm y una *d-d* débil a 800 nm. Este centro, al contrario del cobre Tipo 3, es activo a la EPR. De hecho el espectro presenta siete líneas y la constante de acoplamiento  $A_{||}$  tiene un valor aproximado de  $30 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ .

Este centro está presente en la subunidad II del enzima citocromo *c* oxidasa<sup>241,285,286</sup> y en la oxidonitroso reductasa<sup>287,288</sup>; su función es la transferencia electrónica.

- **Centro de Cu<sub>Z</sub>:** Se trata de un clúster formado por cuatro iones cobre, siete ligandos histidina y tres ligandos adicionales (uno de ellos actúa como puente), probablemente aniones hidroxilos y/o moléculas de agua<sup>287,288</sup>. Según los primeros datos cristalográficos<sup>287</sup>, los cuatro iones cobre forman un tetraedro distorsionado en torno al ligando puente (presumiblemente un ion OH<sup>-</sup>) con distancias O-Cu entre 2.15 y 2.38 Å, lo que hacía suponer que todos los cobres estaban enlazados al oxígeno. Sin embargo, los datos espectroscópicos no apoyaban esta hipótesis<sup>289</sup>. Posteriormente, se demostró por resonancia Raman<sup>288</sup> (*Resonance Raman*, RR) y por estructura fina de la absorción de rayos X<sup>290</sup> (*Extended X-ray Absorption Fine Structure*, EXAFS) que el ligando puente es un ion sulfuro.

Se encuentra, al igual que el centro de Cu<sub>A</sub>, en la enzima oxidonitroso reductasa<sup>288</sup>.

- **Centro de Cu<sub>B</sub>:** Este centro de cobre presenta tres ligandos histidina y está unido al hierro de un grupo hemo *o* mediante un ligando puente cuya naturaleza varía en función de la reacción catalizada. Este centro binuclear forma parte del citocromo *b<sub>o</sub>*<sup>291</sup>.
- **Proteínas Implicadas en la Homeostasis del Cobre:** En los últimos años se comienza a identificar las proteínas implicadas en la captación de cobre por las células y su "tráfico" en el interior de ellas<sup>292-294</sup>. El paso intermembrana se produce a través de una proteína de la familia Ctr (*Copper Transporter*). En este proceso el cobre siempre se encuentra reducido. Una vez dentro de la

célula, proteínas denominadas metalo-chaperones (entre ellas destaca la *anti-oxidant 1*, *Atx1*, y la *copper chaperon for superoxide dismutase*, *CCS*) se encargan de su transporte hasta las proteínas con función catalítica o de transferencia electrónica<sup>292</sup>. Es sólo en este último paso cuando se puede producir la oxidación del cobre. Todas estas proteínas son ricas en ligandos azufre dadores (cisteínas y metioninas).

### 3.2. Proteínas Azules de Cobre

#### a) *Características generales*

Las singulares características espectroscópicas de las proteínas azules de cobre atrajeron el interés por las mismas desde su descubrimiento<sup>260,295-298</sup>. Son proteínas de masa molecular pequeña (de 10 a 20 kDa), con un número de aminoácidos que varía entre 98 y 155. Son generalmente solubles y poseen un centro metálico de cobre Tipo 1, cuya función es la transferencia electrónica. Las BCPs actúan como agentes de transferencia monoeléctrica en procesos biológicos vitales como la fotosíntesis y la respiración<sup>236,261,299</sup>.

La familia de las BCPs es extraordinariamente amplia y está muy extendida en todos los reinos de los sistemas vivos. Estas pequeñas proteínas se encuentran en gran variedad de organismos, tanto en bacterias como en plantas e incluso en tejidos animales. Se han clasificado en varias subclases atendiendo a sus secuencias, estructuras y cadenas de transferencia electrónica donde están implicadas así como a las características de su centro activo. En la Tabla 3 se muestra la clasificación según su origen.

La proteína más estudiada de las BCPs es la plastocianina<sup>299-303</sup> (Pc) presente en plantas, algas verdes y cianobacterias; su función es transferir electrones desde el citocromo-*f* al pigmento P-700 en la cadena respiratoria. Otras proteínas azules de cobre están presentes en plantas superiores formando parte de tejidos no fotosintéticos, constituyen la familia de las fitocianinas<sup>304</sup> y son las estelacianinas<sup>305</sup>, la plantacianina o proteína básica de pepino (*Cucumber Basic Protein*, *CBP*)<sup>306,307</sup> y la uclacianina<sup>308</sup>. La función biológica de estas últimas proteínas no está determinada todavía, sólo se conoce su ubicación en el retículo endoplásmico de las células vegetales<sup>308</sup>. La familia de las estelacianinas está formada por la estelacianina<sup>309,310</sup> (St), la mavicianina<sup>311,312</sup> y la umecianina<sup>313,314</sup>. Son proteínas glicosiladas (aunque se pueden aislar como un dominio único) y presentan una Gln como ligando axial. Cabe destacar que la estelacianina se considera una desviación dentro de las BCPs debido a su bajo potencial redox, a sus características espectroscópicas y a su elevada velocidad de transferencia electrónica<sup>308</sup>.

La halocianina<sup>315-317</sup>, la única BCP encontrada en una arquea, concretamente en la halobacteria *Natronobacterium pharaonis*, se puede clasificar como una BCP típica. Se trata de una

proteína periférica de membrana que actúa como transportador móvil de electrones en reacciones de transferencia electrónica al final de la cadena respiratoria de la halobacteria.

Azurina<sup>298,318-320</sup> (Az), pseudoazurina<sup>321,322</sup> (PsAz), amicianina<sup>323,324</sup> (Am) y auracianina<sup>325</sup> se encuentran en bacterias. Las dos primeras participan en la cadena de transferencia electrónica de diversas bacterias desnitrificantes. La amicianina transfiere electrones desde la metilamina deshidrogenasa al citocromo *C<sub>551</sub>* en las bacterias metilotróficas. La auracianina participa en la reacción fotosintética de una bacteria verde fototrófica.

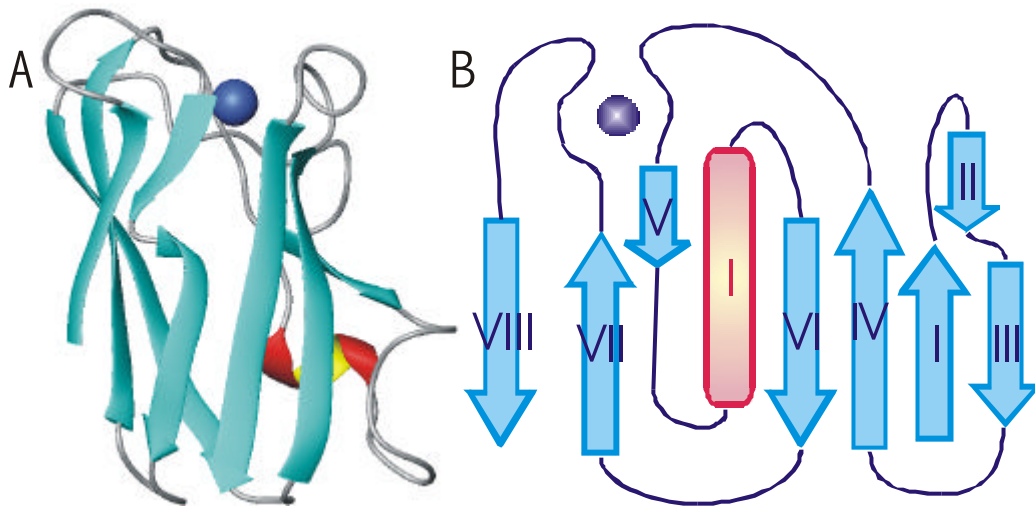
La BCP caracterizada en la presente Tesis, rusticianina<sup>326-328</sup>, Rc (apartado 3.3), pertenece a este último grupo.

**Tabla 3.** Clasificación de las proteínas azules de cobre según el organismo del que proceden<sup>247</sup>.

<i>Proteína</i>	<i>Origen Biológico</i>	<i>Masa Molecular (Da)</i>	<i>Potencial Redox (mV)</i>
Amicianina	<i>Thiobacillus versutus</i>	13800	261
Auracianina	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	12800	240
Azurina	<i>Alcaligenes denitrificans</i>	14000	276
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14600	308
Estelacianina	<i>Rhus vernicifera</i>	20000	184
	<i>Cucumis sativus</i>	14862	180
Halocianina	<i>Natronobacterium pharaonis</i>	15500	223
Mavicianina	<i>Cucurvito pepo medullosa</i>	18000	285
Plantacianina (CBP)	<i>Cucumis sativus</i>	10100	317
Plastocianina	<i>Populus nigra</i>	10500	370
Pseudoazurina	<i>Achromobacter cycloclastes</i>	13400	260
Rusticianina	<i>Thiobacillus ferroxidans</i>	16500	680
Uclacianina	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
Umecianina	<i>Armoracia laphatifolia</i>	14600	283

### b) Estructura tridimensional

Examinando la secuencia de aminoácidos de las BCPs conocidas actualmente, se observa una baja homología en la estructura primaria de todas ellas, exceptuando el extremo C-terminal. Sin embargo, todas las BCPs cuya estructura tridimensional ha sido determinada muestran un plegamiento altamente conservado. Efectivamente, todas ellas son proteínas monoméricas que presentan un plegamiento tipo barril- $\beta$ , definido por dos hojas- $\beta$  que pueden contener entre 6 y 13 hebras siguiendo un patrón denominado de "llave griega". El plegamiento de las BCPs se diferencia del típico barril- $\beta$  de llave griega. En la Figura 7 se muestra, como ejemplo representativo, la estructura tridimensional de la plastocianina<sup>301</sup>.

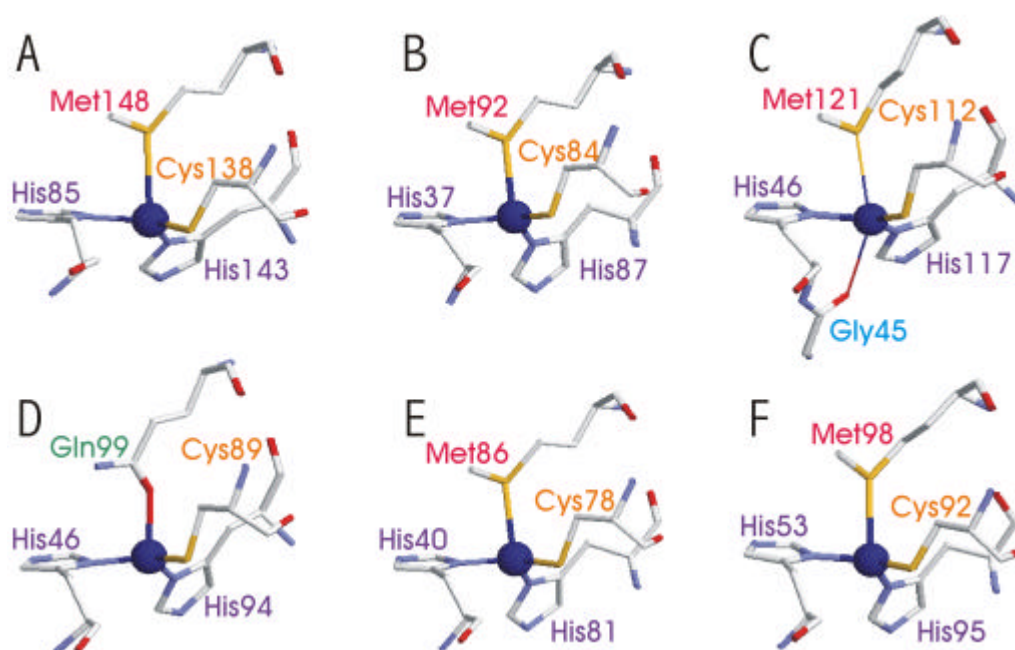


**Figura 7.** A) Estructura Tridimensional de la plastocianina determinada mediante rayos X (archivo 1PLC.pdb<sup>301</sup>); B) Topología de la proteína. Mediante flechas de color celeste se representan las hebras- $\beta$ , numeradas de acuerdo a su aparición en la secuencia primaria de la proteína. El alineamiento paralelo/antiparalelo de éstas pertenece, en este caso, a Pc, aunque se mantiene conservado para todas las BCPs. La hélice- $\alpha$  aparece en rojo. El ion cobre(II) está señalado en color azul.

### c) Estructura del centro activo

Próximo al extremo C-terminal se sitúan los aminoácidos que conforman el centro activo. Este sitio metálico está localizado cerca de la superficie de la proteína, en la zona norte de la molécula. También cerca del centro activo se encuentra el denominado *patch hidrofóbico*<sup>329</sup> que constituye una zona de reconocimiento para las proteínas redox fisiológicamente relacionadas.

Todas las BCPs presentan como característica común una coordinación trigonal CuNNS. Los residuos que actúan como ligandos son dos histidinas (coordinadas a través de sus nitrógenos N $\delta$ 1) y una cisteína (que se une al metal por su azufre S $\gamma$ ). A lo largo de la presente Tesis, denominaremos HisN (N proveniente de “cercano al extremo N-terminal”) al primero de los ligandos histidina de acuerdo con la secuencia primaria, mientras que al segundo ligando lo denominaremos HisC (C de “carboxilo terminal”). Ambos ligandos, no obstante, se encuentran tanto en la secuencia como espacialmente, lejanos de los extremos de la molécula. Existe un cuarto ligando en posición axial, por lo general un azufre tioéter S $\delta$  de metionina, que se une débilmente al ion metálico. En la Figura 8 se muestran los centros activos de seis BCPs (Rc, Pc, Az, St, PsAz, Am). La azurina presenta un ligando adicional<sup>329</sup>, concretamente, un oxígeno carbonílico de glicina en posición *trans* al ligando axial. Esta interacción hace que el cobre se sitúe prácticamente en el plano NNS definido por los tres ligandos ecuatoriales (N $\delta$ 1<sub>His</sub>N $\delta$ 1<sub>His</sub>S $\gamma$ <sub>Cys</sub>)<sup>329</sup>. En el resto de las BCPs, el átomo de cobre se encuentra fuera del plano NNS, desplazado hacia el ligando axial metionina. Finalmente, hay que destacar también que no todas las BCPs poseen éste ligando axial. Concretamente, la estelacianina (St) posee un ligando glutamina, unido al metal por el oxígeno carbonílico de la cadena lateral<sup>192,305</sup> (Figura 8-D). La geometría del cobre en St es típicamente tetraédrica. En la Tabla 4 presentamos algunos parámetros estructurales de estas BCPs.



**Figura 8.** Estructura del centro activo en: A) Cu(II)Rc (fichero 1RCY.pdb<sup>330</sup>); B) Cu(II)Pc (fichero 1PLC.pdb<sup>302</sup>); C) Cu(II)Az (fichero 1DYZ.pdb<sup>331</sup>); D) Cu(II)St (fichero 1JER.pdb<sup>305</sup>); E) Cu(II)PsAz (1BQK.pdb<sup>332</sup>); F) Cu(II)Am (1AAC.pdb<sup>333</sup>).

El sitio de coordinación de las BCPs es óptimo para la transferencia electrónica. Efectivamente, hay un compromiso entre las preferencias del cobre(I), ácido blando con preferencia tetraédrica, y el cobre(II), ácido intermedio que prefiere una coordinación cuadrado-plana. La estructura del sitio metálico de la forma reducida, cobre(I), es casi idéntica a la existente en la forma oxidada, cobre(II), como se ha comprobado en Az<sup>334,335</sup>, Pc<sup>302,336</sup>, Rc<sup>330,337</sup>, PsAz<sup>332,338</sup>, Am<sup>333</sup>. Por otro lado, también se ha comprobado en Az<sup>339,340</sup>, Pc<sup>341</sup> y PsAz<sup>338</sup> que la extracción del ion cobre del sitio activo, generando la apoproteína, sólo provoca cambios mínimos en las posiciones de los restos de aminoácidos implicados en la unión del cobre. Así, el sitio metálico está también definido por las restricciones del plegamiento de la cadena polipeptídica. Ésta es la hipótesis denominada *estado entático*<sup>342,343</sup> de la proteína o *estado rack* (tenso)<sup>260,298</sup>. En efecto, la estructura que rodea al ion metálico es muy poco flexible debido a la existencia de una extensa red de puentes de hidrógeno<sup>261,265,344</sup>. No obstante, existe una cierta flexibilidad para el movimiento del ion metálico según la dirección axial de la pirámide trigonal. Desde el punto de vista funcional, las pequeñas diferencias estructurales entre la forma oxidada y reducida implican una baja energía de reorganización y, por lo tanto, favorecen altas velocidades de transferencia electrónica<sup>261,345,346</sup>.

**Tabla 4.** Parámetros estructurales de los centros metálicos de varias BCPs en estado oxidado.

Proteína	distancia del cobre (Å) a				Cu-plano (Å)	φ (deg) <sup>a</sup>	PDB
	HisN δ1	HisCN δ1	Cys Sγ	L axial			
Rc <sup>b</sup>	2.04	1.89	2.26	2.89(SδM148)	0.32	77.1	1RCY
Am <sup>c</sup>	1.95	2.03		2.91(SδM98)	0.30	79.4	1AAC
Pc <sup>d</sup>	1.91	2.06	2.07	2.82(SδM92)	0.36	81.6	1PLC
Az <sup>e</sup>	2.04	1.99	2.14	3.26(SδM121) 2.72(OG45)	0.01	82.3	1DYZ
St <sup>f</sup>	1.96	2.04	2.18	2.21(OεQ99)	0.32	83.5	1JER
PsAz <sup>g</sup>	1.95	1.92	2.13	2.71(SδM86)	0.30	79.4	1BQK

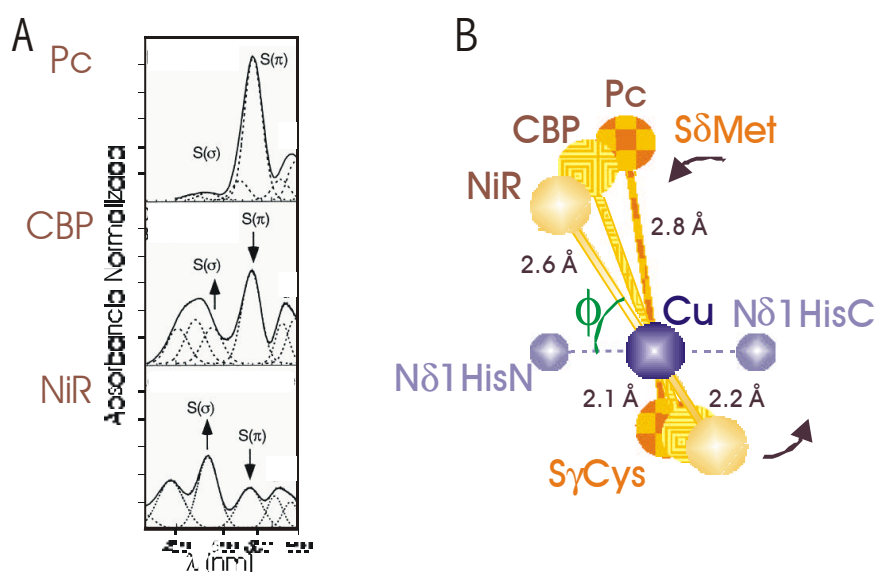
<sup>a</sup> φ es el ángulo formado por los planos CuN<sub>His</sub>N<sub>His</sub> y CuS<sub>Cys</sub>S<sub>Met</sub> (Figura 9). <sup>b</sup> Rusticianina de *Thiobacillus ferrooxidans* a una resolución de 1.90 Å<sup>30</sup>. <sup>c</sup> Amicianina de *Paracoccus denitrificans* a 1.31 Å<sup>33</sup>. <sup>d</sup> Plastocianina de *Populus nigra* a 1.33 Å<sup>02</sup>. <sup>e</sup> Azurina de *Alcaligenes xylooxidans* a 1.75 Å<sup>31</sup>. <sup>f</sup> Estelacianina de pepino (*Cucumis sativus*) a 1.60 Å<sup>305</sup>. <sup>g</sup> Pseudoazurina de *Achromobacter cycloclastes* a 1.35 Å<sup>332</sup>.

### d) Características espectroscópicas

Todas las BCPs se caracterizan por poseer altos coeficientes de extinción molar en el visible y constantes de acoplamiento hiperfino muy pequeñas en EPR. Solomon y sus colaboradores clasificaron los centros azules de cobre como “clásicos” y “perturbados” en función de sus propiedades espectroscópicas<sup>347,348</sup>. Los centros de cobre azul de plastocianina, amicianina y azurina son centros típicamente “clásicos”. El espectro visible de estos centros en su estado oxidado presenta una banda de absorción muy intensa en torno a 600 nm y una banda muy débil alrededor de 450 nm (con un cociente  $\epsilon_{450}/\epsilon_{600}$  menor de 0.08). El espectro EPR es, para estos centros, prácticamente axial. (Figura 8-B, F, C)<sup>225,247,265,349</sup>.

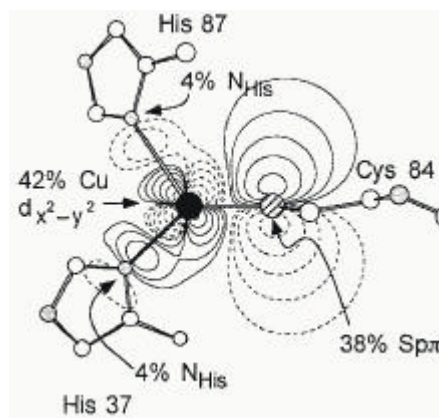
Los centros “perturbados” se distinguen por presentar una relación mayor de absorción de las bandas de transferencia de carga ( $\epsilon_{450}/\epsilon_{600} \approx 0.5$ ) y un espectro EPR marcadamente rómbico<sup>265</sup>. La pseudoazurina, la proteína básica de pepino y la rusticianina pertenecen a este tipo<sup>247</sup>. El límite de un centro azul distorsionado sería un “centro de cobre verde”, como el que se produce en algunas nitrito reductasas<sup>347,350</sup>, donde la distorsión tetragonal es tan alta que la banda a 450 nm es la más intensa.

En la Figura 9 se muestra un ejemplo de las características espectroscópicas y estructurales que presentan los centros clásicos (plastocianina), perturbados (plantacianina) y completamente distorsionados (nitrito reductasa).



**Figura 9.** A) Espectros UV-Vis de Pc, CBP y NiR<sup>265</sup>; B) Esquema de la estructura de los centros activos de estas tres BCPs. El aumento de la banda a 450 nm de Pc y NiR, S(σ) en Figura A, es consecuencia de la disminución del ángulo  $\phi$ , Figura B, que a su vez lleva consigo una mayor interacción del cobre con el ligando axial.

Medidas de EPR en monocristales de plastocianina han mostrado que el orbital  $d_{x^2-y^2}$  (orbital HOMO, donde reside el electrón desapareado) se encuentra en el plano  $\text{CuN}_{\text{His}}\text{N}_{\text{His}}$ <sup>351</sup>. La banda de absorción a 600 nm proviene de la interacción tipo  $\pi$  entre el orbital  $p$  del átomo de azufre y el orbital  $d_{x^2-y^2}$  del ion cobre(II)<sup>320,352</sup>. En la Figura 10 se muestra la orientación relativa de estos orbitales en la plastocianina. La banda LMCT de mayor energía (a 450 nm) proviene de la interacción tipo  $\sigma$  entre los dos mismos orbitales<sup>347,353</sup>. En centros de cobre(II) clásicos (plastocianina) la banda de menor energía, tipo  $\pi$  (600 nm), es muy intensa puesto que predomina la primera interacción. Al aumentar la interacción  $\sigma$  (CBP y NiRs verdes), se incrementa la relación  $\epsilon_{450}/\epsilon_{600}$ . Solomon ha relacionado estas propiedades espectroscópicas con características estructurales de los centros metálicos<sup>347,348</sup>. Concretamente, según sus cálculos y en base a las estructuras de rayos X de diversas BCPs, ha correlacionado la relación  $\epsilon_{450}/\epsilon_{600}$  con el carácter tetragonal de los centros y éste, a su vez, con el ángulo diedro  $\phi$  que forman los planos  $\text{CuN}_{\text{His}}\text{N}_{\text{His}}$  y  $\text{CuS}_{\text{Cys}}\text{S}_{\text{Met}}$  (Figura 9). En la Tabla 4 se muestran estos ángulos en diferentes BCPs. En la Figura 9 se muestra esquemáticamente la orientación relativa de los átomos dadores con respecto al cobre en tres proteínas que representan un centro clásico (plastocianina), un centro perturbado (CBP) y un centro “de cobre verde” (NiR), así como sus espectros visibles. Se observa que, al disminuir el valor del ángulo diedro  $\phi$  aumenta la interacción  $\sigma$ . Paralelamente a la disminución del ángulo diedro  $\phi$  se produce un acercamiento del átomo  $\text{S}_{\delta}$ , de la metionina axial, al cobre. Debido a ello, Solomon indica que en los centros “clásicos” la interacción con la metionina axial es menor<sup>265</sup>. Nuestros resultados de RMN indican, no obstante, que otros factores geométricos deben ser también tenidos en cuenta a la hora de determinar el grado de covalencia del cobre con sus dos átomos de azufre dadores (Capítulo 2 de Resultados).



**Figura 10.** Contorno de los orbitales HOMO de la plastocianina<sup>265</sup>. Se observa una gran anisotropía en la covalencia de la interacción  $\text{Cu-S}_{\gamma}\text{Cys}$  de tipo  $\pi$  antienlazante.



### e) *Potenciales Redox*

Las proteínas azules de cobre presentan potenciales redox entre 180 y 680 mV (Tabla 3). Estos potenciales son más altos que los del par Cu(II)/Cu(I) en medio acuoso ( $\epsilon = 150$  mV). Los valores relativamente altos de los potenciales de reducción de las BCPs son consecuencia del entorno particular de coordinación del ion cobre, que contribuye a estabilizar el cobre(I) frente al cobre(II). El alto grado de covalencia Cu-S $\gamma$ Cys existente en las BCPs estabiliza fundamentalmente el estado de oxidación reducido. En consecuencia, se ha propuesto que este grado de interacción modula el potencial redox de estas proteínas. Una mayor interacción Cu-S $\gamma$ Cys produciría un mayor potencial redox<sup>261,265</sup>. A su vez, también se ha indicado que esta interacción está gobernada por la interacción Cu-S $\delta$ Met, de forma que una mayor interacción entre el ion metálico y la metionina axial llevaría a una disminución de la interacción de aquél con la cisteína<sup>265</sup>.

Las interacciones entre cargas próximas al ion metálico pueden originar modificaciones en los potenciales redox<sup>354</sup>. En las BCPs el azufre tiolato del ligando cisteína forma enlaces de hidrógeno con grupos N-H amida de la proteína. Como resultado de esta interacción disminuye la cesión de densidad electrónica del ligando al metal, lo cual contribuye, a su vez, a aumentar el potencial redox del centro activo. El potencial redox de una proteína está afectado, por lo tanto, no sólo por la estructura electrónica del sitio metálico sino también por otros factores como la naturaleza dieléctrica del entorno del sitio activo (solvatación e hidrofobicidad), la distribución de carga en el mismo, la polarizabilidad en torno al metal, la formación de puentes de hidrógeno y factores entrópicos<sup>261,355</sup>.

### f) *Mecanismos de transferencia electrónica*

La función de las BCPs es transferir un electrón en las cadenas biológicas de transporte electrónico<sup>236,257,299</sup>. La forma oxidada, Cu(II)BCP, es capaz de aceptar un electrón de otro miembro de la cadena dando lugar a la formación de la especie reducida, Cu(I)BCP. Ésta, a su vez, transfiere posteriormente dicho electrón a su aceptor fisiológico regenerándose de nuevo la forma oxidada.

La velocidad de transferencia electrónica entre metaloproteínas depende de varios factores. Entre ellos cabe destacar<sup>356,357</sup>:

- La fuerza conductora de la reacción (energía libre de Gibbs).
- La energía de reorganización asociada a las diferencias estructurales entre la forma oxidada y la reducida.
- La distancia entre los centros metálicos del dador y aceptor de electrones.
- La naturaleza del medio donde se produce la transferencia electrónica.

- Los procesos de reconocimiento y asociación entre la proteína dadora y la aceptora de los electrones.

Las BCPs tienen una estructura tal que optimizan en muchos casos los factores anteriores, de modo que la transferencia electrónica tiene lugar de forma muy rápida. Para ello requiere una energía de reorganización pequeña, es decir, que los cambios estructurales asociados a la transferencia electrónica sean mínimos. La geometría más estable del cobre(II) es la cuadrado-plana, mientras que para el cobre(I) la más frecuente es la tetraédrica. Sin embargo, la geometría que presenta el centro metálico de las BCPs es intermedia entre ambas, más próxima a la de Cu(I). Los centros clásicos presentan una geometría tetraédrica distorsionada trigonalmente<sup>261</sup>. La proteína impone al cobre(II) una geometría inusual, de mayor energía, más parecida a la preferida por el cobre(I), generando un alto potencial redox. Vallee y Williams denominaron este estado del cobre(II) *estado entático*<sup>342</sup>. Malmström lo definió como *estado rack* o tenso<sup>296</sup> del ion metálico. Actualmente hay autores que discuten estas dos hipótesis<sup>358</sup>, aunque, en general, es todavía admitida<sup>226,261,265</sup>. Así la proteína posee un sitio metálico que, además de unir con alta afinidad el cobre en sus dos estados de oxidación, minimiza la barrera de reorganización estructural para la transferencia electrónica. El plegamiento en forma de barril- $\beta$  de estas proteínas diseña la estructura del centro metálico, que no se ve afectado, más que mínimamente, por la eliminación del metal. En otras palabras, el metal está atrapado en un hueco de la proteína y este hueco genera un estado restringido para el cobre(II). El diseño especial del centro activo asegura que la esfera de coordinación y el metal formen un excelente sitio de transferencia electrónica de potencial controlado y energía de reorganización mínima.

Por otra parte, la transferencia electrónica tiene lugar, en la mayoría de las BCPs, a través del *patch hidrofóbico*, minimizándose la distancia entre los metales<sup>329</sup>. Esto genera una zona hidrofóbica situada encima del sitio metálico que rodea al anillo de imidazol del ligando histidina expuesto al disolvente. La transferencia electrónica desde el centro metálico tiene lugar a través de esta histidina<sup>359</sup>.

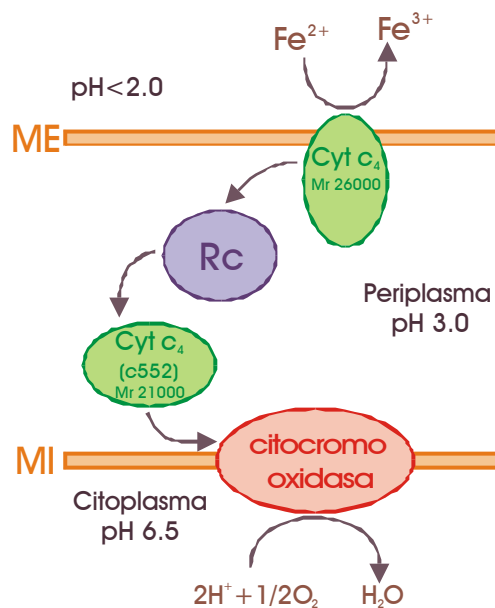
### 3.3. **Rusticianina**

#### a) *Función fisiológica*

La rusticianina (Rc) se encuentra en la bacteria gram-negativa *Thiobacillus ferrooxidans*<sup>327,360</sup> (*Tf*). Para su crecimiento estos organismos requieren aire y hierro(II) que oxidan para obtener la energía. Viven en medios extremadamente ácidos (a valores de pH entre 4.0 y 1.5). *Tf* se utiliza en la industria extractiva para la extracción de cobre, uranio y cobalto mediante lixiviación microbiana<sup>361</sup>. Así mismo, es capaz de eliminar metales pesados de desechos industriales

o del suelo y eliminar el azufre de combustibles fósiles evitando la corrosión y la deposición de ácidos de la atmósfera<sup>362</sup>.

La rusticianina es una proteína soluble y se encuentra en el periplasma. Es la proteína más abundante de *Tf*, constituyendo el 6.5% del peso total de las proteínas que contiene esta bacteria. Tradicionalmente Rc se ha considerado el primer aceptor de electrones de la cadena respiratoria de *Tf* debido a su alto potencial redox<sup>326,363</sup> (Tabla 3). Esta hipótesis se discute actualmente y, de hecho, ciertos autores proponen la existencia de otra proteína intermedia entre Rc y los iones hierro<sup>364,365</sup>. El mecanismo propuesto se muestra en la Figura 11.



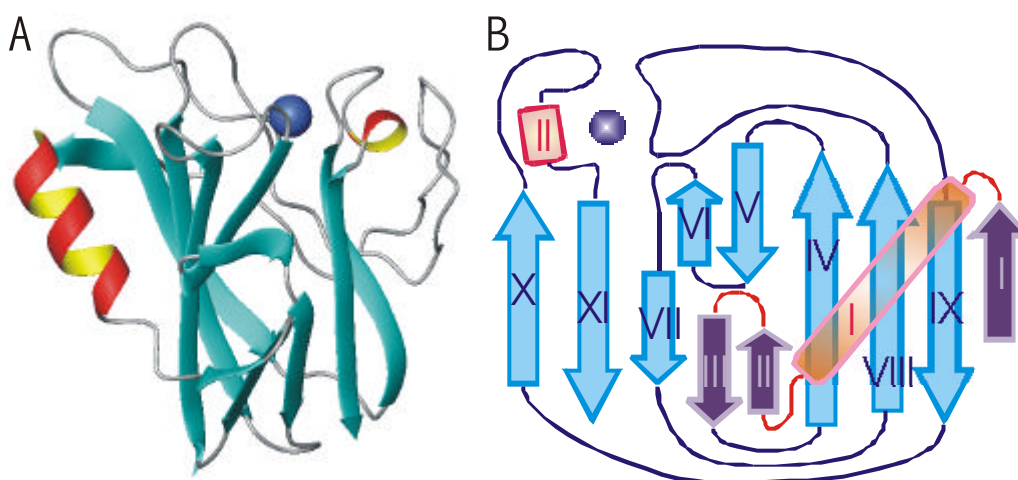
**Figura 11.** Mecanismo de transferencia electrónica propuesto entre el ion ferroso y el oxígeno en *Tf*<sup>364,365</sup>. ME, membrana externa; MI, membrana interna; cyt *c*<sub>4</sub>, citocromo *c*<sub>4</sub>.

Según este mecanismo el primer aceptor de los electrones provenientes del hierro sería un citocromo *c*<sub>4</sub> de 26 kDa de masa molecular<sup>364,365</sup>. El potencial de este citocromo es menor que el de Rc ( $430 \pm 20$  mV), pero este valor aumenta cuando se forma el complejo con Rc. Sería, pues, según estos estudios, este complejo Rc-cyt *c*<sub>4</sub> el aceptor final de electrones de los iones hierro(II). Por otra parte, la rusticianina forma un complejo bastante estable con otro citocromo *c*<sub>4</sub> de 21 kDa de masa molecular<sup>366</sup>. Muy recientemente estos mismos autores han resuelto la estructura de este citocromo y han modelado mediante docking la forma de unión de Rc con esta proteína. Según este estudio la transferencia electrónica entre las dos proteínas se produciría a través del His143Nε1 de Rc y uno de los Glu121Oγ del cyt *c*<sub>4</sub><sup>367</sup>. La formación de este segundo complejo hace disminuir en 100 mV el potencial redox de Rc y altera la geometría de coordinación del metal, seguramente debido a la

desprotonación de His143, que es la más expuesta al disolvente. Esta caída del potencial puede ser necesaria para que tenga lugar el flujo electrónico desde Rc al segundo citocromo  $c_4$  (de 21 kDa)<sup>366</sup>. Este citocromo cedería su electrón a la citocromo oxidasa que reduciría, en último término, el oxígeno molecular.

### b) Estructura

La masa molecular de Rc, determinada mediante espectrofotometría de masas, es  $16550 \pm 2$  Da<sup>368</sup>. Se trata de una proteína monomérica que posee un átomo de cobre tipo 1. Está formada por una cadena de 155 aminoácidos siendo, de entre las BCPs identificadas hasta el momento, la que posee la secuencia primaria más larga. En la Figura 12 se muestra la estructura tridimensional de Rc.



**Figura 12.** A) Estructura tridimensional de la rusticianina determinada mediante rayos X (fichero 1RCY.pdb<sup>330</sup>); B) Topología de la proteína en donde se destacan, en distinto color, los cuatro elementos de estructura secundaria (hebras- $\beta$  I, II, y III y hélice- $\alpha$  I) que forman el extremo N-35 terminal. Mediante flechas de color celeste se representan las hebras- $\beta$ , numeradas de acuerdo a su aparición en la secuencia primaria de la proteína. Las dos hélices- $\alpha$  aparecen en rojo. El ion cobre(II) está señalado en color azul.

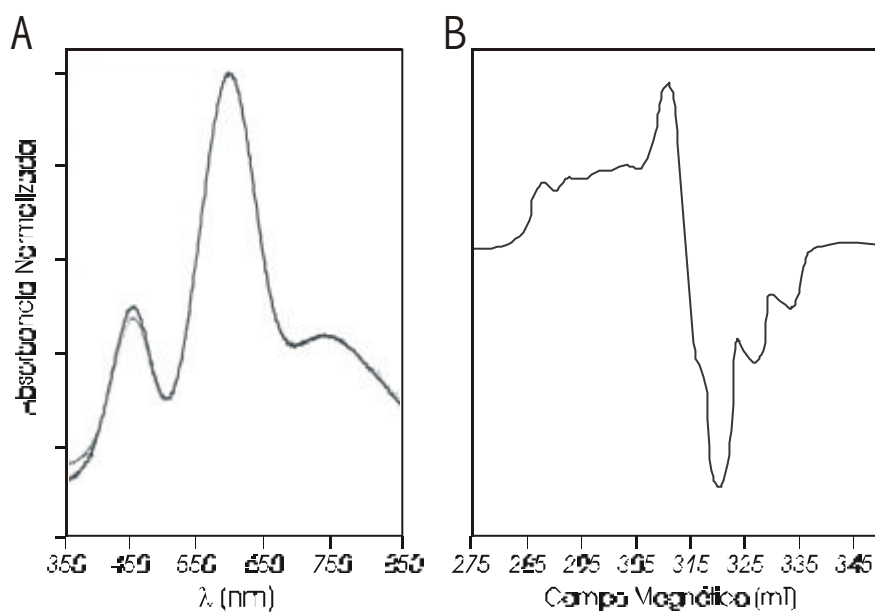
La estructura tridimensional de la rusticianina ha sido determinada tanto en estado sólido<sup>330,369</sup>, como en disolución<sup>370</sup>. Como todas las BCPs, presenta una estructura de tipo barril- $\beta$  formado por once hebras- $\beta$ . Una característica singular de Rc no presente en el resto de BCPs (compárense Figuras 7-B y 12-B) son sus primeros 35 aminoácidos (extensión N-35 de aquí en adelante). Estos 35 aminoácidos forman una hélice- $\alpha$  próxima al extremo N-terminal bastante larga (residuos 11-20). Esta hélice se encuentra empaquetada con la hoja- $\beta$  mediante interacciones

hidrofóbicas. La extensión N-35 se completa con tres hebras- $\beta$  (una previa y dos posteriores en la secuencia a la hélice- $\alpha$ ). Se ha propuesto que esta extensión protege, en cierta medida, el corazón hidrofóbico de Rc haciéndola menos accesible al disolvente<sup>371</sup>. El papel de estos primeros 35 residuos en las propiedades de Rc es ampliamente discutido en el Capítulo 4 de Resultados de esta Tesis.

El centro metálico presenta el patrón de coordinación típico para el cobre en las BCPs (Figura 8-A). Los átomos dadores son los nitrógenos N $\delta$ 1 de las histidinas 85 y 143, el azufre S $\gamma$  de la cisteína 138 y el azufre tioéter S $\delta$  de la metionina 148. Este último presenta una unión más débil<sup>330</sup> (Tabla 4).

### c) Características espectroscópicas

El espectro electrónico de la rusticianina en estado oxidado<sup>368</sup> (Figura 13-A) presenta una banda LMCT a 592 nm muy intensa, con un coeficiente de extinción molar 2240 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. En este espectro se observan además dos bandas adicionales a 740 nm y a 449 nm. Esta última tiene un  $\epsilon$  de 1077 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> y es debida a una transición de carga S $\gamma$ Cys $\rightarrow$ Cu  $d_{x^2-y^2}$  que aparece también en otras BCPs. En la zona del UV presenta un máximo a 280 nm ( $\epsilon = 15700$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) típico de los grupos aromáticos de proteínas.



**Figura 13.** A) Espectro de absorción visible de la rusticianina de cobre(II) (tampón acetato 100 mM, pH 4.0)<sup>368</sup>; B) Espectro de EPR (banda-X) de Cu(II)Rc<sup>368</sup>.

El espectro de EPR de Cu(II)Rc se muestra en la Figura 13-B<sup>368</sup>. Se trata de un espectro rómbico y presenta el desdoblamiento hiperfino pequeño en la región de  $g_{||}$  ( $A_{||} = 4.5$  mT) característico de los centros metálicos de cobre Tipo 1.

Por estas características espectroscópicas el centro metálico de Rc posee distorsión tetragonal, es decir, pertenece al grupo de centro “perturbado” según la clasificación de Solomon<sup>265,348</sup>.

### **3.4. RMN aplicado a BCPs**

El cobre tiene dos isótopos estables magnéticamente activos, <sup>63</sup>Cu y <sup>65</sup>Cu, por lo que el núcleo de cobre es activo en la espectroscopía RMN. Sin embargo, ambos núcleos tienen un número cuántico de espín  $I = 3/2$  y poseen momento cuadrupolar. El acoplamiento entre el momento de espín nuclear y el momento cuadrupolar en una macromolécula, que tiene una rotación lenta, aumenta la velocidad de relajación nuclear del cobre de modo que las señales de RMN de este núcleo son demasiado anchas para ser detectadas<sup>372</sup>. Por lo tanto cuando se estudia una proteína de cobre utilizando la RMN, no se realizan espectros del cobre sino de los núcleos de la proteína (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N).

Ya hemos comentado que el cobre en BCPs presenta dos estados de oxidación, cobre(I) y cobre(II). La influencia de cada uno de los estados en los espectros de RMN es muy diferente. El cobre(I) es un ion metálico  $d^{10}$ , por lo que no tiene electrones desapareados. La influencia del metal en este caso se limita a los átomos directamente enlazados al ion cobre cuyos núcleos se pueden acoplar al núcleo metálico y experimentar la influencia del momento cuadrupolar. Este efecto no ha sido explorado hasta el momento en proteínas. Normalmente no se observan variaciones notables en las velocidades de relajación de los núcleos en las proteínas que contienen el ion cuproso. Los parámetros de RMN en las formas reducidas de las BCPs son, pues, típicamente diamagnéticos.

#### *a) BCPs nativas en estado oxidado*

Por el contrario, cuando el ion cobre está en su estado oxidado causa dramáticos efectos en el espectro de RMN de la proteína, ya que origina velocidades de relajación muy grandes en los protones cercanos a él (Tabla 1).

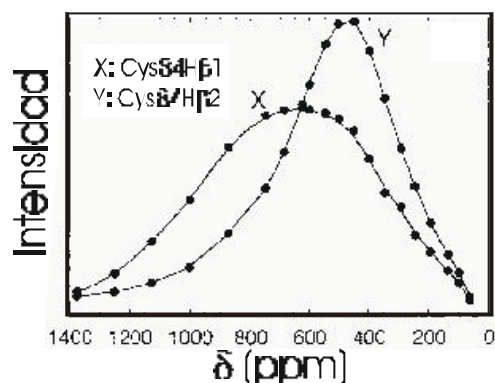
La baja velocidad de relajación electrónica del ion cobre(II) (Tabla 1) dificulta en gran medida el estudio de estas proteínas mediante RMN de sistemas paramagnéticos, llegándose incluso a la no observación de las señales (apartado 2.2). Por este motivo, el estudio de sistemas de cobre(II) mediante RMN de protón era tradicionalmente evitado. No fue hasta 1996 cuando el grupo

del Profesor Canters consiguió asignar el primer espectro de una BCP en su estado oxidado, concretamente, de la amicianina<sup>198</sup>.

Las señales paramagnéticas de los protones pertenecientes a los ligandos del cobre(II) son extremadamente anchas (Capítulo 2 de Resultados). Muchas de estas señales, que se localizan en su mayoría fuera del entorno diamagnético, se pueden detectar realizando espectros *superweft*<sup>251</sup> (apartado 2.3). Sin embargo, las velocidades de relajación son tan elevadas (Tabla 1), que los acoplamientos dipolares y, más aún, los escalares, son extremadamente débiles (apartado 2.3 de Capítulo 2). Por lo tanto, no es posible la asignación de las señales a través de este tipo de acoplamientos. Canters siguió una estrategia diferente para la asignación<sup>198</sup>. Aplicó con éxito la espectroscopía de canje a sistemas de cobre concretamente en Am. En el caso de la azurina, por el contrario, la velocidad de transferencia electrónica en sus condiciones de trabajo era tal, que no pudieron asignar estas señales.

No obstante, no fue hasta tres años después cuando se logró la completa asignación de todos los protones con contribución de contacto en una BCP oxidada<sup>199</sup>. El problema fundamental era la detección y asignación de las señales correspondientes a los protones H $\beta$  del ligando cisteína. Estas señales se encuentran entre 3.0 y 3.4 Å del metal, por lo que su anchura debería ser tal, que no fuera posible su observación. Efectivamente, no era posible observarlas, pero sí se detectaron y asignaron. Esta asignación fue posible mediante el experimento que el grupo de Bertini denominó "NOE ciego"<sup>199</sup>. Se trata de un experimento NOE (obtenido mediante la secuencia *superweft* descrita en el apartado 2.3) con la singularidad de que se hace un barrido de irradiación entre unas pocas partes por millón y hasta unos 1500 ppm, sin observar la señal que se está irradiando. No obstante, si existe una señal en la zona irradiada, se observará una respuesta en el desplazamiento químico correspondiente a ese protón en el estado diamagnético de la proteína (para un Cys H $\beta$  típicamente en la zona de 2.8 a 3.2 ppm). Representando la intensidad de la respuesta frente a la frecuencia de irradiación se obtiene un perfil que indica la posición (el máximo) del protón irradiado así como la anchura de la señal. En la Figura 14 se muestra el perfil obtenido para la irradiación de los Cys84H $\beta$  de la plastocianina<sup>199</sup>.

Posteriormente este tipo de experimentos se han aplicado a la azurina<sup>373</sup>, la estelacianina<sup>373</sup> y a la pseudoazurina<sup>374</sup>. Nosotros los hemos empleado con la rusticianina (Capítulo 2 de Resultados). El conocimiento del desplazamiento de contacto de los Cys H $\beta$  y del resto de las señales proporciona sustancial información sobre la estructura electrónica y el papel de los ligandos y del resto de la proteína en el mantenimiento de la estructura del metal.



**Figura 14.** Perfiles de irradiación de las señales H $\beta$  de Cys84 en Cu(II)Pc<sup>199</sup>.

### b) Sondas espectroscópicas en RMN para BCPs

La sustitución metálica en metaloproteínas es una estrategia habitual en Química Bioinorgánica, en la investigación de estructuras y reactividad de sitios activos para ampliar el abanico de técnicas espectroscópicas con las que estudiar estas metaloproteínas<sup>103,375,376</sup>. Como previamente se ha considerado<sup>377</sup>, podríamos decir que la sustitución metálica es una mutación de la proteína. Se trata de un método útil para explorar la estructura, función y propiedades físico/químicas del metal y del resto de la molécula. El cambio del ion metálico nos permite, también, obtener conclusiones acerca del papel que desempeña la metaloproteína en el sistema biológico. Si el metal realiza una función estructural, la estabilidad de la metaloproteína se verá afectada por el cambio. El cambio del ion metálico lleva a la variación (en general disminución, aunque a veces, incremento) de la actividad catalítica en la mayoría de los enzimas<sup>103,172,375</sup>. El estudio de las propiedades cinéticas en estos metaloderivados se puede utilizar para elucidar detalles del mecanismo del enzima nativo.

En las proteínas de cobre este ion metálico ha sido sustituido por cobalto, níquel, manganeso, mercurio y cadmio, entre otros<sup>107</sup>. El estudio de estas metaloproteínas derivadas es importante para la elucidación de la estructura tanto electrónica como molecular del sitio metálico. Las BCPs son proteínas extraordinariamente rígidas<sup>261</sup> (Capítulo 4 de Resultados). El cambio del metal produce sólo mínimas variaciones en el entorno de coordinación del ion metálico. Sólo se ha resuelto la estructura tridimensional de tres derivados metalosustituidos de BCPs, Co(II)Az<sup>378</sup>, Ni(II)Az<sup>379</sup> y Hg(II)Pc<sup>380</sup>. En estas estructuras el ion metálico presenta la misma geometría de coordinación que el ion nativo. En el caso de CoAz existe un pequeño desplazamiento del ion metálico hacia el oxígeno carbonílico de Gly45 axial (en Co(II)Az las distancias Co-OGly45 y Co-S $\delta$ Met121 son 2.21 y 3.56 Å respectivamente)<sup>378</sup> (Tabla 4). El mismo efecto se observa en la NiAz: el metal se coordina más fuertemente al oxígeno de la Gly45, mientras que el enlace con Met121S $\delta$



se alarga hasta 3.30 Å<sup>379</sup>. Los resultados presentados en estos sistemas metalosustituídos de BCPs son, por lo tanto, completamente trasladables al sistema nativo, como ha quedado refrendado en numerosos trabajos<sup>185,187,188,191,192,195,197,230,245,246,349,377,381-383</sup>.

El cobalto(II) es la sonda espectroscópica que más información ha aportado al conocimiento del entorno metálico de las BCPs mediante RMN. Como hemos comentado (apartado 2.2) los espectros de RMN de <sup>1</sup>H de las BCPs metaladas con cobalto(II) se caracterizan por una gran dispersión de sus señales, mucho mayor que en otros sistemas (incluido las proteínas nativas oxidadas, Cu(II)BCPs). Esta propiedad ha permitido caracterizar detalladamente, no sólo la esfera directa de coordinación sino también el entorno del ion metálico. Conviene resaltar que estos estudios se realizan en disolución y que la sensibilidad de los parámetros de RMN a pequeños cambios estructurales es, en estos sistemas, mayor que la observada mediante difracción de rayos X. Un ejemplo de esta afirmación, las conformaciones posibles de Ile140 en la rusticianina, se discute en la presente Tesis (Capítulo 1 de Resultados).

La información deducida a partir de este tipo de experimentos sobre la estructura y función de las BCPs es numerosa. Podemos destacar:

- Determinación de la velocidad de transferencia del protón de la histidina más expuesta al disolvente. La autotransferencia electrónica se produce, según se había propuesto, a través de esta histidina<sup>384</sup>. Para que ello fuera posible, la velocidad de transferencia electrónica debería ser superior al tiempo de permanencia del protón HNε2 en la histidina (este protón intercambia con el agua). Las medidas de velocidad de cambio de este protón con el disolvente demostraron que ambos hechos eran compatibles<sup>377</sup>.
- Determinación del aminoácido responsable del cambio conformacional y del potencial redox de azurina con el pH. El potencial redox de la azurina, como el de la mayoría de las BCPs, varía con el pH. Los espectros de CoAz mostraron las sutiles variaciones en torno al ion metálico, paralelas al cambio del potencial redox<sup>188,189</sup>. A partir de estos estudios también se demostró que la protonación/desprotonación de la His35, una histidina no coordinada al metal situada a unos 6 Å y que forma enlace de hidrógeno con el oxígeno carbonílico de Met44, es la responsable de los pequeños cambios conformacionales y del potencial redox con el pH<sup>191</sup>.
- Covalencia del enlace metal-azufre de metionina y metal-oxígeno de glicina en azurina. La distancia existente entre el metal y estos dos ligandos (3.26 y 2.72 Å, Tabla 4) ha llevado a discusión la covalencia de ambos enlaces. La observación de desplazamiento hiperfino para estas señales<sup>230</sup> confirma que el metal está enlazado a ambos átomos covalentemente. Estudios análogos<sup>192-194,245,246,382</sup> confirman este hecho en otras BCPs como se demostrará más adelante en la presente Tesis (Capítulo 1 de Resultados).
- Grado de covalencia de los azufres de cisteína y metionina al metal. A partir de los desplazamientos hiperfinos de estas señales se ha elucidado la diferente fuerza de enlace entre el cobalto y estos átomos dadores (uniones decisivas en la termodinámica y cinética de

estas proteínas) para diferentes BCPs<sup>172,191,230,245,246,385</sup>. Estos datos son trasladables<sup>199,373</sup> al sistema nativo (Capítulos 1 y 2 de Resultados).

- Existencia de un enlace de hidrógeno entre el S $\gamma$  de la cisteína coordinada al metal y el protón peptídico del aminoácido posterior a la HisN coordinada. En todas las estructuras de las BCPs resueltas, el nitrógeno peptídico del aminoácido posterior a la primera de las histidinas coordinadas al metal y el S $\gamma$  de cisteína se encuentran lo suficientemente cerca para que formen enlace de hidrógeno. No obstante, por difracción de rayos X no se observan los protones. Mediante RMN de paramagnéticos aplicada a CoAz se observó que tanto el protón peptídico como el protón- $\alpha$  de la Asn47 (aminoácido posterior a la His46, HisN en Az) poseían contribución de contacto<sup>230,377</sup>.
- Elucidación del ligando axial y de su átomo dador unido al metal en estelacianina. La estelacianina es una BCP que posee una glutamina en la posición equivalente a la metionina axial en su estructura primaria<sup>309</sup>. Debido a esto, se suponía que esta glutamina era el ligando axial del cobre en St. La confirmación de este hecho provino de estudios de CoSt mediante RMN de paramagnéticos<sup>192,245</sup>. Así mismo, se dedujo que la unión debía producirse por el oxígeno O $\epsilon$  de la cadena lateral de la glutamina (existían dudas de si la unión se produciría por el oxígeno o por el nitrógeno). La resolución de la estructura terciaria de St por difracción de rayos X<sup>305</sup> confirmó esta forma de unión.

La sustitución del Cu(II) por Ni(II) en BCPs proporciona menor desplazamiento de pseudocontacto que el Co(II), pues este ion metálico posee menor anisotropía magnética<sup>172</sup>. Además, el Ni(II) posee menos afinidad que el Co(II) por los sitios metálicos de las BCPs. Por estos dos motivos se ha utilizado menos que el Co(II) como sonda espectroscópica en BCPs.

El cambio de cobre por níquel en BCPs se ha realizado con éxito en Az<sup>187,188,190,195,197,230,377,383,385</sup> en St<sup>194</sup> y PsAz. El hecho de que este derivado posea una anisotropía magnética casi despreciable permitió afirmar que el desplazamiento hiperfino observado para los protones de NiAz correspondía a la contribución de contacto. Esta contribución era muy alta para los H $\gamma$  de la metionina axial, lo que supuso una prueba experimental de la existencia de enlace covalente entre el metal y este aminoácido.

Otras informaciones también deducidas en NiAz (observadas paralelamente en CoAz) son el cambio conformacional con el pH de Az y la velocidad de transferencia de canje de HisC en Az.

Así mismo, también se han utilizado otros núcleos en RMN como sondas espectroscópicas, pero no observando los protones sino el núcleo mismo. Caben destacar el cadmio-113 y el mercurio-199. El cadmio(II) presenta un isótopo estable activo en RMN. La sustitución del Cu(II) por Cd(II) ha permitido obtener información adicional del centro activo de las BCPs mediante espectroscopía de RMN <sup>113</sup>Cd<sup>386,387</sup>. Los desplazamientos químicos del <sup>113</sup>Cd son muy sensibles a la

naturaleza de los átomos dadores. Las asignaciones de las señales  $^1\text{H}$  de la Cu(I)- y Cd(II)-plastocianina evidencian ligeros cambios estructurales debidos a la sustitución metálica<sup>387</sup>.

El mercurio(II) es también un ion metálico diamagnético, sin embargo el  $^{199}\text{Hg}$  es activo al RMN. Los desplazamientos químicos de  $^{199}\text{Hg}$  son muy sensibles a los cambios en la esfera de coordinación del metal<sup>388</sup>. Esta sensibilidad se ha empleado para estudiar los centros activos de distintas BCPs<sup>389,390</sup>. Las señales de  $^{199}\text{Hg}$  en BCPs tienen valores de  $T_1$ , un orden de magnitud menor que el  $^{113}\text{Cd}$  en el mismo sitio activo. Esto supone otra ventaja del mercurio(II) respecto al cadmio(II) puesto que a la mayor sensibilidad de las señales hay que añadir la mayor rapidez en la adquisición de los espectros de RMN<sup>389,390</sup>.

## 4. Proteínas que unen Calcio: Calbindina D<sub>9k</sub>

### 4.1. El Calcio en Sistemas Biológicos

El calcio participa en gran número de funciones fisiológicas; tantas, que sería prácticamente imposible describirlas todas en una sucinta introducción como la que aquí presentamos. En este capítulo pretendemos dar una visión general del papel del calcio en sistemas vivos. No profundizaremos en el tema puesto que queda fuera del objetivo de esta Tesis.

De entre los procesos biológicos en los que participa el calcio podemos destacar: i) controla la estabilidad mecánica de paredes y membranas celulares y de la tensión en toda la variedad de filamentos presentes en las células<sup>257,391,392</sup>; ii) forma parte, como constituyente esencial, de los biominales formados por sales de calcio como carbonatos, fosfatos y oxalatos (estos biominales son, a su vez, los constituyentes básicos de los esqueletos de animales y paredes celulares en las plantas); iii) controla también el metabolismo en procesos como el acoplamiento del dioxígeno al proceso de fotosíntesis, el control de deshidrogenasas en la fosforilación oxidativa, reacciones quinasa, etc; iv) la matriz extracelular y sus actividades son calcio-dependientes en los organismos multicelulares.

El calcio presenta dos características que le confieren una química de coordinación muy selectiva. Por una parte, puede interaccionar bien con oxígenos dadores neutros, como son carbonilos y éteres, o bien con aniones. Por otro lado, este ion metálico posee además la capacidad de coordinar un gran número de átomos dadores al mismo tiempo. Los grupos que actúan típicamente como ligandos del calcio son ligandos oxígeno dadores, fundamentalmente carbonilos y carboxilatos<sup>235</sup>.

Debido a la gran diversidad de proteínas de calcio existentes, resulta muy difícil realizar una clasificación. Como en la presente Tesis realizamos el estudio de una proteína de calcio bajo un punto de vista estructural, presentamos aquí una clasificación de estas proteínas basándonos en los tres tipos diferentes de estructuras del centro activo que se pueden encontrar<sup>257</sup>:

- **Centros de calcio con átomos dadores de aminoácidos próximos en la secuencia.** En la proteína estos centros metálicos suelen ser regiones muy móviles pues existe una gran repulsión electrostática debido a la carga negativa. Este tipo de centros coordinan calcio con mucha rapidez. La estructura terciaria de la proteína se reajusta, teniendo lugar sólo modificaciones locales, pero no globales, tras la coordinación del ion metálico. Podemos encontrar este tipo de centro en la calmodulina y en la mayoría de las proteínas intracelulares reguladoras de calcio. La calbindina presenta dos centros de coordinación de calcio de este tipo<sup>392</sup>.
- **Centros de calcio con átomos dadores de aminoácidos no contiguos en la secuencia.** La estructura tridimensional en estas proteínas genera una cavidad bastante rígida donde se aloja el calcio. La unión de éste es, pues, muy dependiente del plegamiento de la cadena polipeptídica. La velocidad de coordinación del Ca(II) en estos sitios es menor que en el grupo anterior. Estas cavidades rígidas y bien definidas no sufren prácticamente ningún cambio conformacional tras la coordinación del ion metálico. Un ejemplo de proteína que presenta este tipo de centro para el calcio es la fosfolipasa A<sub>2</sub><sup>393</sup>, también se da en otras proteínas extracelulares como la nucleasa stafilococal<sup>394</sup> y en uno de los centros de la termolisina<sup>395</sup>.
- **Centros de calcio aniónicos o canales.** El tercer tipo de unión del ion calcio está formado por una larga serie de aniones que se encuentran normalmente en la superficie de polímeros al azar. A través de estos aniones, que sobresalen de la estructura de la proteína, el calcio puede viajar rápidamente. Este tipo de coordinación se encuentra, por ejemplo, en algunas fosfoproteínas<sup>396</sup>, en glicoproteínas aniónicas del tejido conectivo<sup>397</sup> y en el  $\gamma$ -carboxiglutamato que contienen los péptidos de protrombina<sup>398</sup> y de la proteína de los huesos, osteocalcina<sup>399</sup>.

Desde el punto de vista funcional, se han realizado diferentes tipos de clasificaciones, no todas ellas consistentes entre sí<sup>257,392</sup>. No obstante, sí hay una amplia clase de estas proteínas que se engloban siempre bajo el epígrafe de *Proteínas Activadoras de Calcio* y que son especialmente relevantes en esta Tesis puesto que la calbindina D<sub>9k</sub> pertenece a este tipo. Estas proteínas se suelen llamar también calmodulinas por ser ésta la proteína activadora de calcio que más se ha estudiado.

## **4.2. Proteínas Activadoras de Calcio**

### *a) Características generales*

En el interior celular existe una gran variedad de proteínas que coordinan Ca(II). Algunas presentan una rápida respuesta al calcio: la calmodulina o la troponina, mientras que otras, como las calbindinas, la familia S-100 y la familia annexina, presentan una velocidad de coordinación de calcio

mucho menor<sup>391,392</sup>. Estas proteínas son las responsables de que las células presenten una respuesta diferente ante la presencia de Ca(II) en el medio. En la Tabla 5 se citan algunas de ellas, así como la función que realizan.

**Tabla 5.** Algunas proteínas intracelulares que ligan calcio. Se muestran también las proteínas y/o funciones en las que generan respuesta<sup>257</sup>.

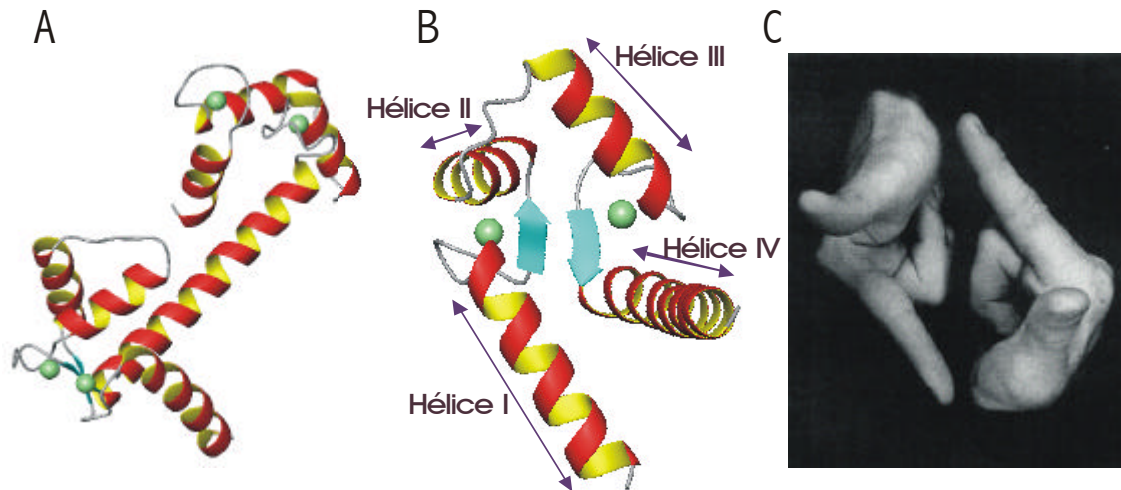
<i>Proteína</i>	<i>Respuesta</i>
Calmodulina	Quinasa Fosfatasa CAMP diesterasa
Troponina C	Actomiosina ATPasa
Gelsolin	Organización de la actina
Calpain	Proteasa
Parvalbúmina	Tampón de calcio
Calbindina	Transportador de calcio
S-100	Ciclo celular
Anexinas	Reacciones vesiculares Adhesiones a membrana
Dominios C-2	Enzimas

La gran diversidad de respuestas celulares ante el calcio(II) dificulta la posibilidad de dar una explicación general, completa y coherente de las mismas. La necesidad de diferentes tipos de proteínas activadoras de calcio nace con la diversidad celular y la necesidad de distintos tipos de activación de los genes. La calmodulina es la proteína activadora de calcio mejor estudiada y por ello se toma como referencia a la hora de explicar esta amplia familia.

### *b) Estructura tridimensional*

Las proteínas activadoras de calcio presentan el mismo diseño estructural básico. Consiste en pares de secuencias cortas (30-40 aminoácidos) que se denominan manos-EF, descritas por primera vez por Kretsinger y Nockols<sup>400</sup>. En la Figura 15 se muestra la estructura tridimensional de la calmodulina en donde se observa la disposición de los elementos secundarios en una de estas

manos-EF. Una mano-EF está formada por dos hélices- $\alpha$ . La configuración de la mano-EF es similar a la de una mano derecha con el pulgar y el índice extendidos formando, aproximadamente, un ángulo recto; los tres dedos restantes están recogidos (Figura 15-B y C). El pulgar está dirigido hacia la región C-terminal de la segunda hélice- $\alpha$ . El índice apunta en la dirección del extremo N-terminal de la primera hélice. Los demás dedos describen el curso del lazo coordinante de calcio. El nombre de este patrón estructural es debido a las hélices E y F de la parvalbúmina<sup>400</sup>.

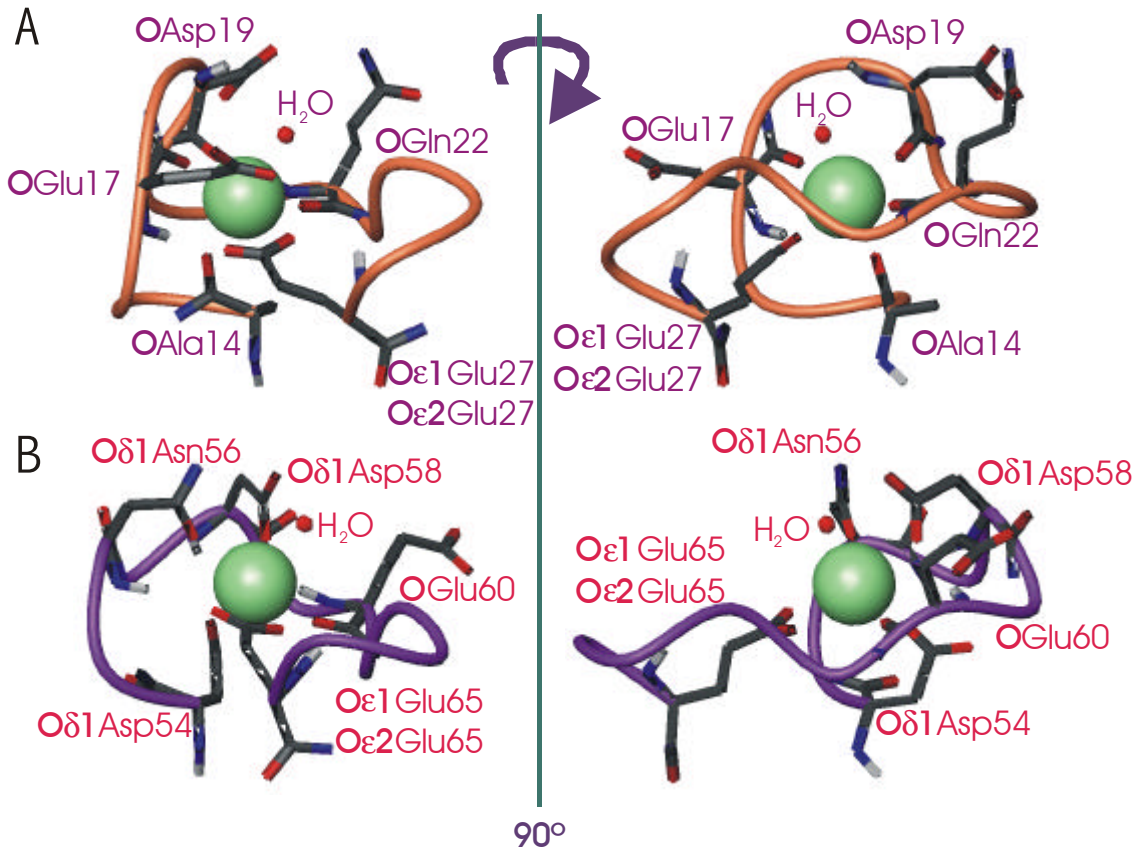


**Figura 15.** A) Estructura tridimensional de la calmodulina (fichero 1CLL.pdb<sup>401</sup>); B) Disposición de las dos primeras manos-EF de la calmodulina; C) Par de manos derechas representando la conformación que presentan las secuencias hélice-lazo-hélice en las proteínas activadoras de calcio.

En las estructuras de proteínas, las manos-EF se suelen presentar por pares disponiéndose una contra otra y suelen estar unidas por dos pequeñas hebras de hoja- $\beta$ . La orientación relativa y la disposición que adoptan las hélices- $\alpha$  determinan los ángulos de enlace de la hoja- $\beta$ . La estructura que adoptan las hélices, por lo tanto, varía en función del número de iones calcio coordinados a la proteína. Los cambios en los lazos y en las zonas expuestas de las hélices suponen los sitios de unión de otras proteínas o de pequeños fármacos (un ejemplo de los últimos es la trifluoroperazina, TFP<sup>257</sup>).

Los lazos de unión de los iones Ca(II) en las manos-EF presentan un alto grado de homología en la secuencia y en la estructura<sup>402</sup>. El sitio de coordinación del ion Ca(II) en los motivos mano-EF comprende un segmento de 12 residuos. En la Figura 16-B se muestra el segundo sitio de unión del calcio en la calbindina que presenta la estructura típica del lazo de coordinación de calcio en la mano-EF. Este sitio metálico presenta una geometría de coordinación de bipirámide pentagonal, donde los siete ligandos son cinco oxígenos carboxílicos de cadenas laterales, un

oxígeno carbonílico del esqueleto y un oxígeno proveniente de una molécula de agua<sup>403</sup>. El primer ligando de esta secuencia es invariablemente un aspartato y el último residuo del lazo suele ser un glutamato. En la mayoría de las manos-EF el sexto residuo del lazo es una glicina, lo cual permite al lazo hacer un giro de 90°<sup>404</sup>. Cuando la mano-EF está metalada, esta Gly forma puente de hidrógeno con el carboxilato no coordinado de la Asp inicial estabilizando el sitio de coordinación metálico.



**Figura 16.** Sitios de coordinación del ion calcio en la calbindina D<sub>9k</sub> (archivo 4ICB.pdb<sup>403</sup>): A) sitio I (pseudo-mano-EF); B) sitio II (mano-EF regular). El ion calcio del sitio II se puede sustituir por iones Ln(III).

### c) Función

Las proteínas activadoras de calcio regulan gran parte de los procesos enzimáticos que se desarrollan en el interior celular. Como ya hemos dicho, existe una gran diversidad de proteínas de este tipo ya que es necesario hacer frente a un gran número de procesos de regulación. Sin embargo, esta variedad de actuación de las calmodulinas es también debida a los procesos de



cooperación: hay numerosos agentes que se coordinan a estas proteínas regulando su respuesta ante la necesidad fisiológica.

El propio ion calcio causa un pequeño cambio en la geometría de la hoja- $\beta$  que sufre un giro de modo que hace girar también las hélices que se desplazan de forma lateral. La unión del ion calcio a la proteína interacciona de forma cooperativa con cualquier otro sitio de unión que pueda existir en la superficie de la proteína<sup>392</sup>.

La calmodulina, por ejemplo, presenta cuatro sitios de unión de calcio. Cada vez que la proteína coordina uno de estos iones metálicos sufre un pequeño cambio conformacional. Esto implica que la estructura cambia y con ella lo hacen las proteínas objetivo de la calmodulina<sup>405</sup>. En otras palabras, la calmodulina actúa sobre un sustrato o sobre otro diverso dependiendo de la estructura que presente; la conformación de la proteína dependerá del número de iones calcio que posea. Este número depende de la concentración de calcio en el medio. Así el calcio es el último responsable de la conformación final que adopte, no sólo la proteína activadora de calcio, sino también de todas las demás sobre las que actúa la calmodulina.

#### d) Familia S-100

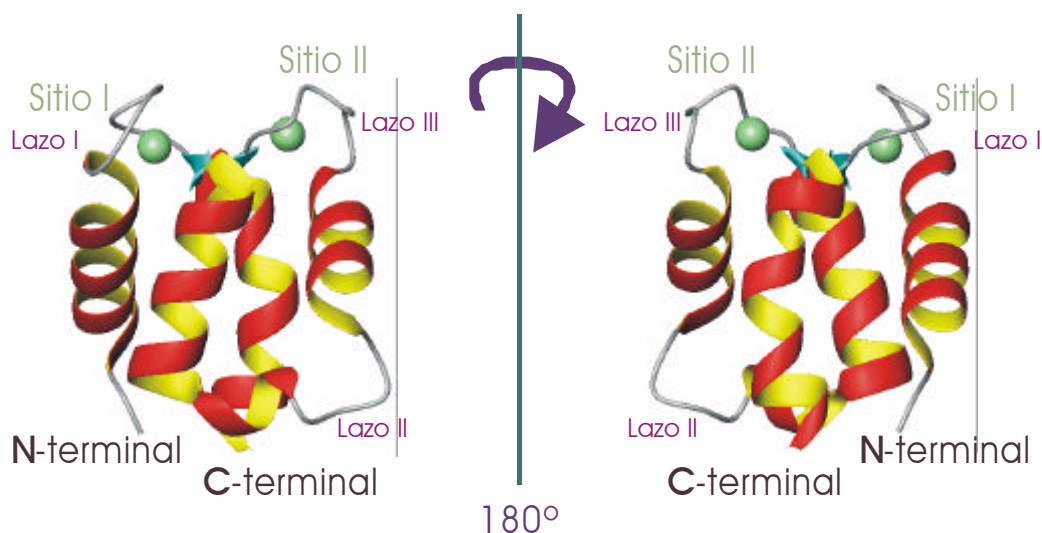
La familia S-100 es una de las más amplias subfamilias de las proteínas con estructura de mano-EF. Está formada por proteínas de bajo peso molecular (8-12kDa) localizadas especialmente en tejidos nerviosos<sup>406</sup>. Todas ellas están formadas por dos manos-EF distintas separadas por una región puente y presentan una región hidrofóbica bastante extensa. Las proteínas de la familia S-100 unen, pues, dos iones calcio por molécula. La mano-EF C-terminal es un lazo de coordinación de Ca<sup>2+</sup> canónico formado por 12 aminoácidos (Figura 16-B), mientras que el lazo N-terminal está formado por 14 aminoácidos y presenta una menor afinidad por el ion calcio (Figura 16-A). Las diferencias que presentan ambas manos-EF en todas estas proteínas se definen detalladamente en el siguiente subapartado para la calbindina D<sub>9k</sub>.

A diferencia de la calmodulina, que se encuentra en todo tipo de tejidos, las proteínas S-100 se encuentran en células específicas, como son neuronas, células epiteliales o gliales<sup>406</sup>. La función de estas proteínas es análoga a la de la calmodulina, participan en la cascada de regulación enzimática<sup>407-409</sup>. De hecho, algunas de las proteínas objetivo de la calmodulina lo son también de las proteínas S-100<sup>410</sup>.

### 4.3. *Calbindina D<sub>9k</sub>*

La calbindina D<sub>9k</sub> es una proteína pequeña (8500 Da) de la familia de las S-100 que liga dos iones calcio<sup>406</sup>. Se clasifica dentro de esta familia por sus características estructurales, a pesar de que su función no es la regulación de procesos enzimáticos sino el transporte del calcio transcelular<sup>411</sup>. Se encuentra principalmente en las células epiteliales del intestino delgado y de la placenta.

Se trata de una de las proteínas de mano-EF mejor caracterizadas estructuralmente. Se ha determinado la estructura nativa con (Ca<sub>2</sub>Cb<sup>403,412,413</sup>) y sin metal (apo-Cb<sup>414</sup>) tanto en disolución como en estado sólido. Así mismo, se han determinado también las estructuras de diversos metaloderivados (CaMgCb<sup>415</sup>, CaCdCb<sup>416</sup>, CaCeCb<sup>219</sup>, CaLnCb<sup>417</sup>). En esta Tesis también presentamos la estructura tridimensional de la CaCeCb D<sub>9k</sub> (Capítulo 5 de Resultados). En la Figura 17 se muestra la estructura tridimensional de la calbindina D<sub>9k</sub> (archivo 4ICB.pdb<sup>403</sup>). La estructura consta de dos motivos mano-EF, cada uno de ellas presenta una secuencia hélice-lazo-hélice, que forma la interacción característica de tipo-β entre los sitios de coordinación del calcio. Las dos manos-EF están unidas por una región situada en el extremo opuesto a los sitios de unión de los iones metálicos en la proteína.



**Figura 17.** Estructura tridimensional de la calbindina D<sub>9k</sub> (archivo 4ICB.pdb<sup>403</sup>). Las hélices-α están representadas en rojo y amarillo; las esferas verdes representan los átomos de calcio coordinados.

Los lazos I y III (lazos N- y C-terminales) constituyen los sitios de coordinación del calcio (Figura 17). El lazo I presenta una secuencia pseudo-mano-EF, peculiar de las proteínas S-100<sup>406,418</sup>, mientras que el segundo sitio de coordinación del ion Ca(II) presenta una secuencia mano-EF regular. La pseudo-mano-EF contiene un sitio de coordinación de calcio más largo que la

regular; está formado por 14 residuos. En la Figura 16-A se muestra el centro de coordinación de este primer sitio de unión de calcio. La geometría de coordinación del centro metálico es una bipirámide pentagonal, siendo los átomos dadores, en su mayoría, oxígenos carbonílicos del esqueleto (Ala14, Glu17, Asp19, Gln22). La esfera de coordinación se completa con la coordinación bidentada del grupo carboxílico del Glu27 y el oxígeno de una molécula de agua. Como consecuencia del patrón de coordinación diferente, el lazo de unión de la pseudo-mano-EF se parece al de la mano-EF regular, pero dado la vuelta, puesto que las cadenas laterales se orientan hacia el disolvente. El segundo sitio de unión (Figura 16-B) posee también una geometría de bipirámide pentagonal. Los ligandos de este segundo sitio de coordinación del calcio en la calbindina D<sub>9k</sub> son: el Asp54, Asn56 y Asp58, que se unen al calcio a través de uno sólo de sus oxígenos carboxílicos, el Glu65, que también se une a través de su grupo carboxílico, aunque en este caso como ligando bidentado, el Glu60, que se une a través de su oxígeno carbonílico del enlace peptídico y, completa la esfera de coordinación, una molécula de agua. En los centros de coordinación de calcio de las pseudo-manos-EF el primer residuo no es un Asp ni tampoco encontramos una Gly ocupando la sexta posición del lazo como ocurre en los sitios de las manos-EF regulares. En la calbindina D<sub>9k</sub> el lazo N-terminal es mucho más selectivo para la coordinación del calcio que el C-terminal<sup>415,419</sup>.

En esta Tesis hemos estudiado la calbindina D<sub>9k</sub> bovina. Esta proteína presenta isomería *cis-trans* en torno al enlace peptídico Gly42-Pro43 que se encuentra en el lazo de conexión entre las dos manos-EF. Cada uno de los isómeros da lugar a señales de RMN diferentes para cada aminoácido<sup>420</sup>. Para evitar esta isomerización, se obtuvo, en primer lugar, el mutante Pro43Gly<sup>421</sup> y, posteriormente, el mutante Pro43Met<sup>422,423</sup>. Se ha comprobado que las diferencias entre los espectros de RMN de estos dos mutantes se reducen a la zona implicada en la mutación (se observan las señales correspondientes a una sola especie)<sup>422,423</sup>. Nosotros hemos trabajado con el mutante Pro43Met.

#### **4.4. RMN de Proteínas de Calcio**

##### *a) Sondas paramagnéticas en RMN para proteínas de calcio*

Los iones lantánidos son, sin lugar a dudas, las sondas espectroscópicas más utilizadas para caracterizar proteínas de calcio mediante RMN. Esto se debe tanto a las propiedades paramagnéticas de estos iones como a la similar afinidad que presentan los lantánidos por los sitios de unión del calcio. Efectivamente, los iones de los elementos de transición interna presentan gran afinidad por los oxígenos y nitrógenos dadores de proteínas y tienen tendencia a rodearse de un número elevado de ligandos<sup>215,235,392,424-426</sup>. El tamaño de los iones Ln(III) hidratados es muy similar al de Ca(II) (0.93-1.10 Å vs. 1.06 Å)<sup>427</sup>, de modo que los sitios de coordinación diseñados para estos últimos iones por las proteínas son idóneos para los metales de la primera serie de transición

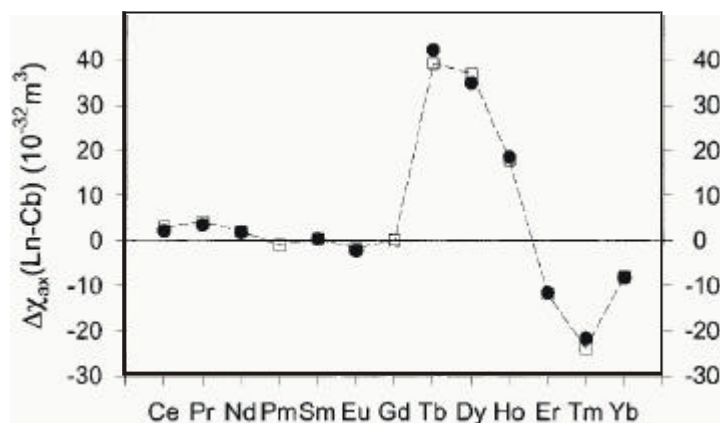
interna. Algunos de estos metaloderivados presentan actividad ya que los cambios conformacionales inducidos por los lantánidos son similares a los que produce el calcio. Además, estos iones pueden interaccionar también con pequeños ligandos, por ejemplo, con antibióticos, del mismo modo que lo hacen las proteínas con su metal nativo<sup>392</sup>.

No obstante, la relevancia del estudio de estos sistemas mediante RMN radica no tanto en la información fisiológica que sobre el sistema se ha obtenido sino en el hecho de que estas proteínas sustituidas por lantánidos son una herramienta ideal para el desarrollo y contraste de la técnica. En este sentido, el grupo de Florencia, con el que hemos realizado los dos capítulos referentes a Cb D<sub>9k</sub> (Capítulos 5 y 6 de Resultados), ha intentado, en el último lustro, explotar las características de estos iones como agentes inductores de restricciones para el cálculo de estructuras en disolución<sup>217,221,249</sup>. Para ello en principio caracterizaron el comportamiento que los iones lantánidos producen en los núcleos cercanos. A pesar de que la teoría del modo de actuación estaba descrita desde antaño<sup>206</sup>, la mayoría de los estudios se habían realizado con pequeños complejos inorgánicos<sup>428</sup>, lo que tenía dos desventajas. En primer lugar, estos complejos solían mostrar flexibilidad en el modo de coordinación del ion metálico. Esto impedía la deducción de propiedades magnéticas (en el campo de RMN) relativas a los iones de estudio. En segundo lugar, el número de restricciones derivadas de los desplazamientos de contacto encontradas era muy limitado, por lo que el número de datos era, en general, insuficiente para contrastar la teoría. La sustitución de iones Ln<sup>3+</sup> por calcio en Cb D<sub>9k</sub> permitió, en una primera fase, confirmar la validez del modelo teórico. Posteriormente, y en esta segunda fase se encuentra nuestro trabajo, el conocimiento de la actuación de estos iones en los núcleos resonantes ha permitido el refinamiento de estructuras en disolución.

El estudio de once derivados mono-sustituidos de CaLnCb (donde Ln representa Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Tb, Dy, Ho, Er, Tm e Yb, todos ellos en estado de oxidación III) permitió determinar las componentes axial y rómbica, así como la orientación del tensor de anisotropía magnética para todos ellos<sup>249</sup>. Esto permitió contrastar los valores de  $\Delta\chi_{ax}$  obtenidos con los esperados según la teoría de Bleaney<sup>206</sup>. En la Figura 18 se comparan los valores experimentales (obtenidos mediante RMN en Cb D<sub>9k</sub>) y los valores esperados de acuerdo con esta teoría para la serie<sup>249</sup>. Como se observa, la concordancia es prácticamente perfecta. Esta gráfica es muy interesante puesto que describe el efecto esperado en magnitud en los  $\rho_{CS}$  para toda la serie de los Ln(III). Por ejemplo, el Ce<sup>3+</sup> ( $\Delta\chi_{ax} = 2.08 \times 10^{-32} \text{ m}^3$ , Figura 18) producirá según la teoría desplazamientos de pseudocontacto inferiores a los del Yb<sup>3+</sup> ( $\Delta\chi_{ax} = -8.26 \times 10^{-32} \text{ m}^3$ , Figura 18) y en sentido opuesto para una misma orientación del tensor de anisotropía magnética. A su vez, el Yb<sup>3+</sup>, producirá desplazamientos mucho menores que, por ejemplo, el Dy<sup>3+</sup> ( $\Delta\chi_{ax} = 34.7 \times 10^{-32} \text{ m}^3$ ).

A partir de estos datos es también muy interesante destacar el posible rango de alcance de cada uno de los iones lantánidos en RMN. Este límite máximo de este rango viene definido como la distancia máxima a la cual se verifica un desplazamiento de pseudocontacto para un determinado

núcleo. Con otras palabras, para una distancia del núcleo al ion metálico mayor que este límite, el núcleo no observará efecto paramagnético alguno en su desplazamiento químico. El límite máximo no depende del núcleo observado (desplazamiento de pseudocontacto, ecuación 21) ya que es independiente de la razón giromagnética. El límite mínimo viene impuesto por la posibilidad de observación de la señal, es decir, de su anchura (ecuación 20). Si un núcleo se encuentra excesivamente cerca de un metal paramagnético experimentará un incremento en su velocidad de relajación transversal (ecuación 17) y, por consiguiente, en su anchura lo cual puede llegar a hacerle no detectable (Capítulo 2).

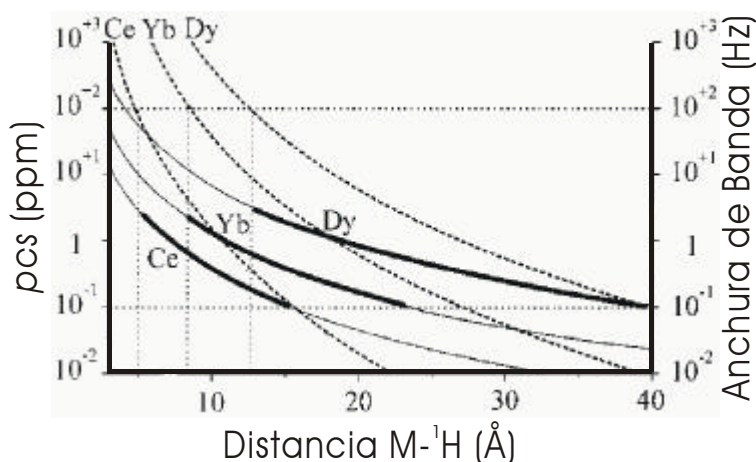


**Figura 18.** Valores experimentales (círculos negros) y calculados según la teoría de Bleaney<sup>206</sup> (cuadrados blancos) de  $\Delta\chi_{ax}$  para los lantánidos indicados en el eje de abscisas. En el sistema CaLnCb<sup>249</sup>.

El incremento en las velocidades de relajación en sistemas con iones lantánidos es (al igual que los *pcs*) proporcional a la susceptibilidad magnética<sup>248</sup>. Por lo tanto, la Figura 18 también puede representar el efecto que tienen los iones lantánidos sobre la anchura de las señales de un núcleo situado a la misma distancia del metal en cada caso. La velocidad de relajación transversal también es proporcional al cuadrado de la razón giromagnética del núcleo observado (ecuación 17). Luego este límite sí dependerá del tipo de núcleo observado, siendo un valor relativamente grande para el protón y mínimo para el nitrógeno. No obstante, este límite es, en la práctica, el mismo para <sup>1</sup>H que para <sup>15</sup>N ya que, por razones de sensibilidad, el <sup>15</sup>N se detecta siempre vía <sup>1</sup>H. El núcleo de <sup>13</sup>C, sin embargo, puede detectarse y asignarse independientemente de los protones covalentemente unidos a él puesto que su sensibilidad es relativamente grande<sup>372</sup>. Para los núcleos de <sup>13</sup>C, por lo tanto, el límite inferior es menor que para el protón. Estos rangos de alcance se han determinado para el Ce<sup>3+</sup>, el Yb<sup>3+</sup> y el Dy<sup>3+</sup>. En la Figura 19 se representa el efecto del *pcs* y de la anchura de la señal en función de la distancia para un protón presente en un sistema con uno de estos tres iones lantánidos<sup>248</sup>. Como se observa el Ce<sup>3+</sup> es operativo para protones situados entre aproximadamente 5 y 15 Å del ion metálico. El Yb<sup>3+</sup> (con una anisotropía magnética cuatro veces superior a la del

$\text{Ce}^{3+}$ ) es operativo entre 9 y 25 Å, mientras que el  $\text{Dy}^{3+}$  (cinco veces más efectivo que el  $\text{Yb}^{3+}$  y unas veinte veces más que el  $\text{Ce}^{3+}$ ) presenta un intervalo válido de acción entre 13 y 40 Å<sup>248</sup>.

Caracterizado el porqué y el cómo los diferentes iones lantánidos afectan al desplazamiento hiperfino de los núcleos cercanos, se diseñó también la metodología para aplicar el efecto de los *pcs* a la resolución de estructuras utilizando Cb como sistema<sup>218-221,248,417</sup>. En estos trabajos se utilizaron *pcs* de  $^1\text{H}$  y  $^{15}\text{N}$  obtenidos para el ion  $\text{Ce}^{3+}$ . La familia obtenida tenía una desviación estándar (*root mean squared deviation, rmsd*) para el esqueleto de  $0.52 \pm 0.11$  Å<sup>248</sup>. Nosotros ampliamos este estudio, como se comenta detalladamente en el Capítulo 5 de Resultados, incluyendo más asignaciones (entre éstas, mayor número de *pcs*), los acoplamiento dipolares residuales (Capítulo 2 de Fundamentos Teóricos), tiempos de relajación longitudinal y las distancias metal-átomos dadores obtenidas a partir de la asignación de señales. En ese estudio también aumentamos el número de restricciones diamagnéticas (ángulos diedros, enlaces de hidrógeno) en el cálculo de la estructura.



**Figura 19.** Rango útil de acción de los iones  $\text{Ce(III)}$ ,  $\text{Yb(III)}$ , y  $\text{Dy(III)}$  en función de la distancia (líneas gruesas)<sup>248</sup>. Las líneas continuas representan el *pcs* observado por un núcleo en función de la distancia (eje de ordenadas de la izquierda). Para un *pcs* inferior a 0.1 ppm se asume que la contribución de pseudocontacto es despreciable (límite inferior de las líneas gruesas). Las líneas discontinuas representan las anchuras de las señales de  $^1\text{H}$  en función de la distancia al ion metálico (eje de ordenadas de la derecha).

### b) Sondas diamagnéticas en RMN para proteínas de calcio

Como hemos comentado en los apartados anteriores, las proteínas de calcio participan en numerosos procesos biológicos, por ello, representan un interesante sujeto de estudio desde el punto de vista bioquímico. Sin embargo, el ion  $\text{Ca}^{2+}$  es, en general, invisible para la mayoría de las técnicas espectroscópicas. El isótopo  $^{47}\text{Ca}$  supone una excepción ya que es activo a la RMN ( $I = 7/2$ ), pero su abundancia natural es muy pequeña. Los estudios de RMN de  $^{47}\text{Ca}$  realizados

proporcionan detalles sobre las propiedades de coordinación de las proteínas de calcio<sup>429</sup>. Este núcleo presenta dos problemas como sonda de RMN: i) su elevado momento cuadrupolar; ii) su baja abundancia natural. Esta última característica encarece las muestras de RMN porque se deben marcar con <sup>47</sup>Ca. El primer inconveniente se ha logrado circunvalar estudiando una transición *single quantum* ( $m_i = 1/2 \rightarrow -1/2$ ) que proporciona una señal relativamente estrecha<sup>430,431</sup>. Debido a estos inconvenientes de las proteínas de calcio, se suelen estudiar sus derivados metalosustituidos.

Como ya describimos para las BCPs, (Capítulo 3) el cadmio presenta un isótopo activo a la RMN, <sup>113</sup>Cd, que se ha utilizado para la caracterización del centro activo de las proteínas de calcio<sup>429</sup>.

Finalmente, conviene recordar que el Profesor Ad Bax al que se debe, sin duda alguna, la mayor parte del desarrollo de secuencias de pulsos heteronucleares y de la teoría y aplicación de experimentos de RMN actuales, ha trabajado con una proteína de calcio, la calmodulina como sujeto de estudio<sup>39,41,55,60</sup>. Los resultados de estos trabajos, que constituyen en muy buena parte el desarrollo reciente (últimos veinte años) de la RMN, han sido utilizados ampliamente en esta Tesis. En las secciones de Fundamentos Teóricos y Materiales y Métodos se describen tanto la teoría como las secuencias de pulsos correspondientes.





## II. Fundamentos Teóricos



# 1. Cálculo de Estructuras en Sistemas Paramagnéticos

## 1.1. Cálculo de Estructuras en Sistemas Diamagnéticos

El cálculo de la estructura tridimensional de una proteína en disolución consiste en encontrar el conjunto de estructuras cuyas coordenadas atómicas satisfagan el mayor número de restricciones experimentales proporcionadas por los distintos parámetros de RMN. Se trata de un proceso puramente estadístico. El método de cálculo que se utilice debe ser capaz de ajustar todas estas restricciones experimentales y de explorar adecuadamente el espacio conformacional.

Nosotros, en esta Tesis, hemos utilizado la metodología bien establecida del Prof. K. Wüthrich<sup>28,432</sup>. El programa original para cálculo de estructuras DIANA<sup>433</sup> (*Distance geometry Algorithm for Nmr Applications*) se basa en la búsqueda de un mínimo de una función blanco o diana (*target function*, TF) mediante la variación de los ángulos diedros de una cadena polipeptídica. Esta función diana está definida de modo que se anula cuando la estructura satisface todas las restricciones experimentales y su valor aumenta a medida que estas restricciones son violadas por la estructura calculada. Revisiones posteriores de este programa (programas DYANA<sup>143</sup>, *Dynamics Algorithm for Nmr Applications*, y CYANA, *the Combined assignment and dYnamics Algorithm for NMR Applications*) lo han implementado introduciendo un cálculo de *simulated annealing*<sup>434,435</sup> previo al cálculo de geometría de distancias, de modo que se consigue una convergencia más rápida al mínimo de la función.

En todos los programas de cálculo de estructuras a partir de datos de RMN se introducen una serie de restricciones obtenidas experimentalmente por esta técnica. Las restricciones que podemos denominar “clásicas” son las siguientes:

- **NOEs:** estas restricciones son, todavía en la actualidad, la base del cálculo de cualquier estructura en disolución. Los NOEs observados en un espectro RMN son proporcionales a las distancias internucleares y, por lo tanto, constituyen una fuente esencial de información estructural. Sin embargo, los NOEs no proporcionan distancias exactas ya que están afectados por la movilidad y por el fenómeno de difusión de espín<sup>28</sup>. En los programas de cálculo los

valores de los NOEs se introducen como cotas superiores e inferiores de las distancias interprotónicas.

- **Constantes de Acoplamiento:** las constantes de acoplamiento proporcionan información sobre los ángulos diedros a través de los cuales se establece el acoplamiento escalar. Las constantes homonucleares a tres enlaces,  ${}^3J_{HH}$ , se pueden relacionar con estos factores geométricos a través de la expresión matemática de Karplus correspondiente<sup>9,46</sup>. Estos parámetros geométricos se incluyen como restricciones en los programas de cálculo de estructuras. El uso de heteronúcleos ha permitido ampliar extensamente el número de las constantes de acoplamiento determinadas y, por tanto, el de ángulos incluidos en la determinación de estructuras<sup>44,436-441</sup>.
- **Enlaces de Hidrógeno:** la observación de átomos de hidrógeno amídicos en muestras de agua deuterada indica, en general, una mínima tendencia al intercambio de estos protones con el disolvente. Cuando en el curso de un cálculo de estructuras aparece uno de estos protones como perteneciente a un puente de hidrógeno, se entiende (y consecuentemente se introduce como restricción) que se produce el correspondiente enlace de hidrógeno. Actualmente existen secuencias de pulsos heteronucleares que detectan directamente la existencia de estos enlaces de hidrógeno<sup>442</sup> (apartado 2.3 de Materiales y Métodos).

Así mismo, y aunque no proceda de un dato experimental de RMN, el programa DIANA (y sus programas derivados) incluye los radios de Van der Waals de cada átomo como restricciones adicionales.

En la última década se han incluido nuevas restricciones en los programas de cálculo de estructuras tales como: los acoplamientos dipolares residuales,  $rdc$ <sup>59,443-446</sup> (a los que explícitamente nos referimos en el siguiente Capítulo de la presente Sección), los ángulos obtenidos a partir de efectos de la correlación cruzada,  $ccr$  (*cross correlation rates*)<sup>58,417,447</sup> o restricciones derivadas del Índice de Desplazamiento Químico,  $csi$  (*Chemical Shift Index*)<sup>448,449</sup>.

## 1.2. Restricciones Paramagnéticas

La presencia de un ion metálico paramagnético en la proteína proporciona un conjunto adicional de restricciones<sup>450</sup>. Estas restricciones llamadas “paramagnéticas” son las velocidades de relajación longitudinal, los desplazamientos de pseudocontacto ( $pcs$ ) y los desplazamientos de contacto. En esta Tesis se presenta un ejemplo de la versatilidad que estas restricciones proporcionan en el cálculo de estructuras de metaloproteínas. El programa que hemos utilizado para realizar los cálculos de estructuras es PSEUDYANA<sup>144</sup>. Este programa permite incluir los desplazamientos de

pseudocontacto como restricciones adicionales en el cálculo de estructuras de macromoléculas paramagnéticas. Para ello se ha incluido en DYANA una rutina suplementaria. PSEUDYANA permite determinar la localización del ion metálico en la estructura de la proteína a partir de un tensor de susceptibilidad magnética previamente calculado mediante los *pCS*. Actualmente se ha desarrollado una nueva versión del programa PSEUDYANA, denominado PARAMAGNETIC-DYANA<sup>221</sup>, en el que se incluyen además los valores de correlación cruzada, *CCF*.

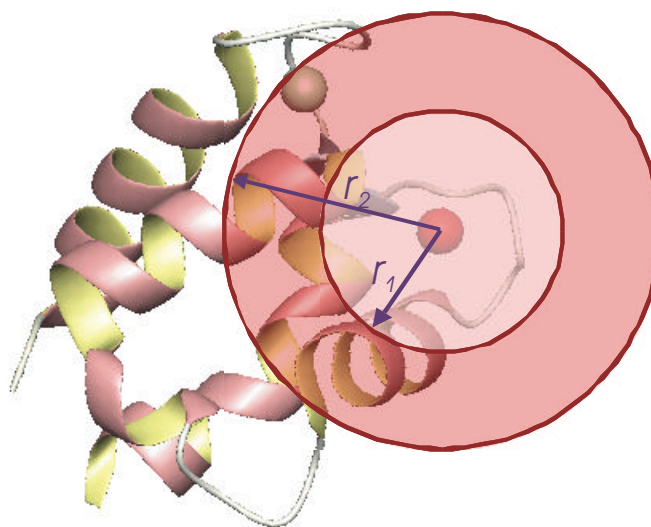
En los siguientes subapartados se describe cada una de las restricciones paramagnéticas, así como la manera de introducirlas en el cálculo de estructuras.

### a) Velocidades de relajación longitudinal

La velocidad (o su inversa, el tiempo) de relajación longitudinal de un núcleo debida a su interacción dipolar con dicho centro,  $R_1^{\text{dip}}$ , viene dada por la ecuación de Solomon (ecuación 16). Por lo tanto, la determinación de esta velocidad indica una medida directa de la distancia núcleo-centro paramagnético. Esta información es de corto alcance, depende de  $r^{-6}$  y, por lo tanto, se circunscribe a un entorno muy cercano del centro metálico. Además, se trata de una interacción isotrópica (en la ecuación de Solomon no existe dependencia angular alguna). En la Figura 20 se muestra el tipo de información estructural. Los denominados límites de distancias inferiores, *lower distance limits (lol)*, en la metodología de Wüthrich<sup>28</sup>, son, para los  $R_1^{\text{dip}}$ , una esfera centrada en el ion paramagnético con un radio  $r_1$  tal que el núcleo resonante debe encontrarse a una distancia al metal superior. Los límites de distancias superiores, *upper distance limits (upl)*, que se representan por la esfera de radio  $r_2$  en la Figura, definen la posición más alejada a la que un protón podría encontrarse del metal con un determinado valor de  $R_1^{\text{dip}}$ .

Este tipo de restricciones tiene el mismo origen que el efecto NOE (interacción dipolar) y su dependencia con la distancia es análoga. Sin embargo, existen dos diferencias entre las restricciones que proporcionan los NOEs y las que proporcionan las  $R_1^{\text{dip}}$ . En primer lugar, debido a la difusión de espín, muchas veces es más conveniente interpretar las distancias protón-protón (NOEs) como dependientes de  $r^{-4}$  o de  $r^{-5}$ <sup>433</sup>. En cambio, el efecto de la difusión de espín para núcleos cercanos al centro paramagnético es siempre despreciable respecto a la relajación debida al paramagnetismo y además está comprendida en el término  $R_1^{\text{dia}}$  (ecuación 11), por lo que sigue una dependencia del tipo  $r^{-6}$ . Por otra parte, el cálculo estructural es posible mediante las restricciones NOE porque existe un conjunto numeroso de protones que eliminan la ambigüedad debida a la carencia de información angular. En el caso de las  $R_1^{\text{dip}}$  el paramagnetismo proviene, en general, de un solo ion metálico, esta ambigüedad no se elimina y la información estructural es mucho más escasa. No obstante, esta información puede ser, en algunos casos, decisiva para determinar la orientación del esqueleto de la proteína o de una cadena lateral cerca del centro activo. Así mismo, es importante destacar que los valores de  $R_1^{\text{dip}}$  proporcionan una restricción experimental que indica la posición del ion metálico, por lo que, en sistemas paramagnéticos, la definición de los centros metálicos en la proteína posee

una resolución mucho mayor que en sistemas diamagnéticos análogos resueltos por RMN (donde esta información se pierde).



**Figura 20.** Representación del intervalo de acción de las velocidades de relajación longitudinales. Los núcleos observables cuyas  $R_1^{\text{dip}}$  se ven afectadas por la presencia del ion paramagnético (corona roja) son los comprendidos entre las esferas de radio  $r_1$  y  $r_2$ .

Resumiendo, la información que proporciona la relajación longitudinal está muy restringida a una corteza esférica muy cercana al centro paramagnético. No hay información angular.

No sólo los tiempos de relajación longitudinales del protón sino también de otros núcleos pueden utilizarse como restricciones aunque, debido a la dependencia de los  $R_1^{\text{dip}}$  con la razón giromagnética (ecuación 16), cada conjunto de núcleos debe tratarse de forma diferente. Por el mismo motivo que el comentado para los protones, sólo los heteronúcleos muy cercanos al centro metálico sienten este efecto paramagnético. En consecuencia, muy pocos tiempos de relajación longitudinal de núcleos de  $^{13}\text{C}$  y, en menor medida de  $^{15}\text{N}$ , pueden utilizarse como restricciones.

No hemos comentado el uso de los  $R_2^{\text{dip}}$  con la misma finalidad. Aunque en principio también podría usarse la relajación transversal para fijar distancias núcleo-metal, su intervalo de actuación es muy inferior (los  $R_2^{\text{dip}}$  disminuyen muy rápidamente con la distancia al metal) y la precisión en su determinación también. Además la contribución diamagnética no suele ser despreciable, de modo que introduce un error considerable en la estimación de la relajación transversal paramagnética<sup>451</sup>. Como consecuencia, los  $R_2^{\text{dip}}$  no se suelen utilizar como restricciones. Sólo se han empleado en el cálculo de estructuras de moléculas donde el aumento de la anchura de banda está ocasionado por radicales<sup>452-456</sup>.

### b) Desplazamientos de pseudocontacto

La contribución al desplazamiento químico que presenta un núcleo por su interacción dipolar con un centro paramagnético,  $\rho_{CS}$ , viene dado por la ecuación 7. En esta ecuación se relaciona un parámetro experimental,  $\delta^c$ , con parámetros estructurales ( $r$ ,  $\mathbf{f}$ , y  $\mathbf{g}$ ) y con las componentes del tensor de anisotropía magnética. Conocido el tensor de anisotropía magnética del metal, los valores de  $\rho_{CS}$  obtenidos para un conjunto de núcleos sirven como restricciones experimentales en el cálculo de estructuras. Debido a la dependencia con  $r^{-3}$ , se trata de restricciones de medio alcance y, ya sólo por este motivo, pueden aplicarse a más núcleos que las restricciones provenientes de las  $R_1^{dip}$ . Además, debido a la dependencia angular, la información que proporcionan los  $\rho_{CS}$  presenta una menor degeneración que la proporcionada por las  $R_1^{dip}$ . En definitiva, los  $\rho_{CS}$  tienen mayor valor estructural que las  $R_1^{dip}$ .

Así mismo, los desplazamientos de pseudocontacto de carbono-13 y nitrógeno-15 pueden introducirse, junto con los  $\rho_{CS}$  de protones, en el mismo tipo de calibración, puesto que estos parámetros no dependen de la razón giromagnética del núcleo (ecuaciones 7 y 21).

Los  $\rho_{CS}$  son particularmente útiles en los alrededores del ion metálico paramagnético, donde los NOEs son generalmente menos numerosos porque se incrementa la relajación de los núcleos y disminuye la intensidad de los picos de cruce. Al igual que para las restricciones provenientes de las  $R_1^{dip}$ , los  $\rho_{CS}$  permiten ubicar la posición del ion metálico respecto a la proteína.

### c) Desplazamientos de contacto

Las restricciones paramagnéticas que hemos presentado hasta ahora,  $R_1^{dip}$  y  $\rho_{CS}$ , están relacionadas con parámetros estructurales mediante expresiones matemáticas deducidas teóricamente (ecuaciones 16 y 7). Sin embargo, no hay ninguna teoría que relacione, de forma general, el desplazamiento de contacto,  $\delta^{on}$ , observado para un determinado núcleo con propiedades estructurales. La carencia de una expresión matemática general es debida a que este tipo de relaciones depende no sólo de los mecanismos operativos que contribuyen al desplazamiento de contacto (Capítulo 2 de la Introducción), sino también de la naturaleza del metal, de los ligandos, de la geometría de coordinación, etc. En definitiva, sólo se puede plantear correlacionar el desplazamiento de contacto con propiedades estructurales desde un punto de vista empírico. De hecho sólo mediante la comparación de estos desplazamientos en sistemas análogos se han podido encontrar tales relaciones. En el caso de las proteínas hierro-azufre, se ha encontrado una dependencia entre los  $\delta^{on}$  de los protones- $\beta$  y carbonos- $\alpha$  de las cisteínas coordinadas a los iones hierro y el ángulo diedro Fe-S $\gamma$ -C $\beta$ -C $\alpha$ , mediante una relación tipo Karplus y su parametrización correspondiente<sup>457</sup>. En proteínas hierro-azufre se han aplicado estos parámetros para refinar estructuras<sup>167,458,459</sup>. No obstante, no se han podido determinar relaciones análogas en

## II. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

---

otro tipo de proteínas y, en consecuencia, queda restringido hasta la fecha el uso de los **d**<sup>con</sup> a estos sistemas.



## 2. Orientación Molecular

### 2.1. Acoplamiento Dipolares Residuales

Todos los núcleos activos en RMN ( $I \neq 0$ ) generan momentos magnéticos cuando se introducen en un campo magnético. Estos momentos interactúan dipolarmente (a través del espacio) entre sí. En RMN de estado sólido, los momentos magnéticos no cambian su orientación relativa, ni tampoco con respecto al campo magnético externo, por lo que el acoplamiento dipolar es muy intenso. Además, al poseer cada núcleo una orientación diferente, existe una elevada anisotropía magnética que origina un conjunto de desplazamientos químicos muy diverso para un mismo núcleo (anisotropía del desplazamiento químico o *CSA*). Debido al acoplamiento dipolar y a la anisotropía magnética existente en muestras sólidas, los espectros de RMN de sólidos presentan señales con anchuras del orden de kHz. Estos dos parámetros proporcionan una alta información estructural de las muestras, aunque, al mismo tiempo, originan una muy baja resolución intrínseca de los espectros, por lo que sólo se pueden estudiar sistemas relativamente simples. Para obtener mayor resolución en estado sólido se debe recurrir a técnicas que eliminen los intensos acoplamiento dipolares. Un ejemplo de estas técnicas es el denominado RMN de alta resolución mediante giro alrededor del ángulo mágico (*High Resolution Magic Angle Spinning*, HRMAS)<sup>460</sup>.

En RMN en disolución la situación es completamente distinta. Los acoplamiento dipolares se eliminan casi en su totalidad. En efecto, el movimiento de rotación molecular promedia todas las orientaciones de los momentos magnéticos y su suma resulta prácticamente nula. Como consecuencia, las señales de un espectro de RMN en disolución son señales estrechas y bien resueltas. No obstante, aunque el acoplamiento dipolar disminuye, no desaparece en su totalidad. De hecho, gracias a este acoplamiento se observan efectos como el NOE. El efecto NOE se debe a la relajación cruzada debida a la interacción dipolar del campo fluctuante de un núcleo con los espines cercanos al mismo<sup>253</sup>. Este acoplamiento dipolar residual en disolución proporciona información estructural intrínseca del sistema<sup>60</sup>.

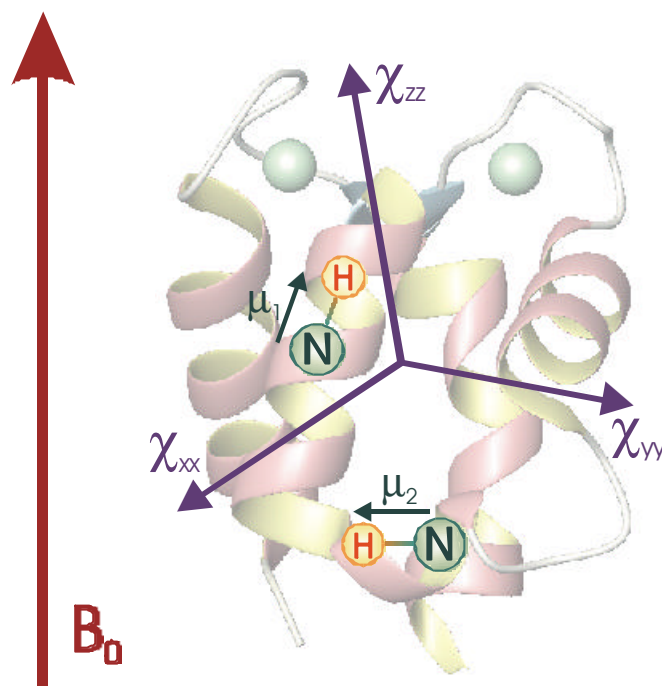
Si una molécula posee alta anisotropía magnética, bien debido a que su tensor de rotación es no isotrópico, bien a la introducción de elementos que provoquen esta anisotropía (ver más adelante), no sólo sus núcleos, sino la molécula misma se orienta en presencia de ese campo magnético. Como resultado, no todos los dipolos muestran la misma orientación entre sí y con

respecto al campo magnético externo. En consecuencia, habrá una diferencia en la magnitud del acoplamiento dipolar entre los núcleos en función de cómo estén orientados éstos respecto al tensor de anisotropía magnética. Supongamos dos pares de núcleos  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  situados en posiciones diferentes de una proteína (Figura 21). Suponemos, también, que estos dos pares  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  están en zonas rígidas de la molécula, es decir, que giran con la rotación de ella, esto es, ambos tienen  $\tau_c = \tau_c$  (Capítulo 2 de la Introducción). Si la molécula gira rápidamente y/o de forma isotrópica, el acoplamiento dipolar entre el núcleo de  $^{15}\text{N}$  y su protón unido será el mismo para los dos N-H, independientemente de la posición de estos pares en la molécula. Sin embargo, si la molécula se orienta de una forma determinada respecto al campo magnético, el acoplamiento dipolar entre estos núcleos dependerá de cómo se orienten ellos respecto al tensor de anisotropía magnética molecular. Cada par de núcleos presentará un acoplamiento distinto en cada una de las moléculas. La rotación en estos sistemas no promedia los acoplamientos dipolares. Las diferencias en estos acoplamientos se deben a una orientación determinada. En consecuencia, la medida de estas diferencias (*rdc*) proporciona información sobre la orientación de los dipolos con respecto al tensor de anisotropía magnética del sistema. Esta información es independiente de la distancia a un sistema de referencia y puede, lógicamente, utilizarse en la resolución de estructuras de proteínas. Ha sido ampliamente aplicada en el refinamiento de estructuras previamente resueltas<sup>147,445,446</sup> y en la determinación de la orientación relativa entre dominios existentes de una misma proteína<sup>146,461,462</sup>.

La variación de los acoplamientos dipolares en función de la orientación de los dipolos respecto al tensor de anisotropía magnética se manifiesta en los parámetros de RMN. De entre todos ellos, las constantes de acoplamiento heteronucleares a un solo enlace,  $^1J_{\text{HX}}$ , son, con toda seguridad, los parámetros experimentales de RMN más simples de analizar. Más concretamente, las constantes  $^1J_{\text{HN}}$  sólo dependen de la distancia  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ , 1.02 Å, constante para todos los pares de una molécula, de la anisotropía del desplazamiento químico de los núcleos  $^{15}\text{N}$  (*CSA*) y de la posible orientación de cada par  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  con respecto al tensor de anisotropía magnética. Por todo ello, las constantes  $^1J_{\text{HN}}$  son los parámetros más extensamente utilizados para medir los *rdc*<sup>60,218,222,444,463-466</sup>.

Como acabamos de comentar, para medir los *rdc* es necesario que la molécula se oriente en un campo magnético (Figura 21). Cuanto mayor sea el campo magnético, tanto mayor será la orientación de la molécula. A pesar de todo, estos efectos sólo se han podido estudiar en la práctica con el desarrollo de los espectrómetros de campo alto (600 MHz o más)<sup>444</sup>. No obstante, la orientación que produce en las moléculas un campo alto no es, en muchas ocasiones, suficiente para obtener valores de *rdc* significativos y que proporcionen restricciones en el cálculo estructural. Por ello se recurre a diversos métodos que orientan las moléculas en disolución; entre ellos podemos destacar: el uso de bicelas fosfolipídicas<sup>467</sup>, de fagos filamentosos<sup>466</sup>, de geles de poliacrilamida o también fragmentos de membrana de bacterias como la membrana púrpura de *Halobacterium salinarum*<sup>468,469</sup> y virus<sup>470</sup>. Nosotros en esta Tesis hemos empleado un método diferente: el uso de iones metálicos paramagnéticos, concretamente iones lantánidos, para producir la orientación de la molécula. En el uso de este método han sido pioneros el Prof. J. H. Prestegard<sup>59</sup> (Universidad de

Yale, New Haven), Prof. D. Marion<sup>145-147</sup> (Instituto de Biología Estructural, Grenoble) y el Prof. Bertini<sup>218,221,471</sup>.



**Figura 21.** Proteína en la que se destacan dos pares  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  con la orientación de sus vectores magnéticos ( $\mu_1$  y  $\mu_2$ ) respecto al campo magnético y al tensor de anisotropía magnética de la proteína,  $\chi^{\text{mol}}$ . El acoplamiento dipolar residual de cada uno de los pares es debido a la orientación de la molécula que no promedia todas las orientaciones posibles por igual. La diferencia entre el *rdc* de uno y otro par informa sobre cómo están orientados los dipolos magnéticos entre sí y con respecto a dicho tensor.

Los iones lantánidos poseen una elevada anisotropía magnética (Capítulo 2 de la Introducción), por lo que son ideales para orientar moléculas en disolución. A partir de los *rdc* determinados para proteínas con iones lantánidos es posible refinar sus estructuras tridimensionales. En esta Tesis se presenta un ejemplo de refinamiento de estructuras con *rdc*, trabajo que se llevó a cabo durante una de mis estancias en el Laboratorio de Florencia.

Los *rdc* se obtienen a partir de la medida de las constantes de acoplamiento  $^1J_{\text{HN}}$ . Al valor de esta constante a un campo dado,  $B_0$ , contribuyen diversos términos<sup>444</sup>:

$$^1J_{\text{HN}}(B_0) = ^1J_{\text{HN}}(0) + \text{rdc} + \mathbf{d}_{\text{dfs}}(B_0) \quad [23]$$

donde  $^1J_{\text{HN}}(0)$  es la constante de acoplamiento escalar independiente del campo, *rdc* es la contribución proveniente del acoplamiento dipolar residual y  $\mathbf{d}_{\text{dfs}}(B_0)$  es el denominado

desplazamiento de la frecuencia dinámica (*dynamic frequency shift*,  $dfs^{472,473}$ ). Este último factor es debido a la correlación cruzada entre el *csa* del  $^{15}\text{N}$  y los mecanismos de relajación del acoplamiento dipolar de  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ . El término  $^1J_{\text{HN}}(0)$  se puede eliminar al hacer las medidas de la constante a dos campos magnéticos diferentes, 18.8 T (800 MHz) y 11.7 T (500 MHz), en nuestros experimentos. Así, la diferencia de los valores de *rdc* a estos campos ( $\Delta rdc$ ) viene expresada por:

$$\Delta rdc = -[(J_{800\text{ MHz}} - J_{500\text{ MHz}}) + (d_{dfs,800\text{ MHz}} - d_{dfs,500\text{ MHz}})] \quad [24]$$

El signo negativo de la ecuación 24 tiene en cuenta que el acoplamiento escalar a un enlace es negativo<sup>59</sup>, aunque los datos experimentales de las constantes se suelen expresar en valores positivos. Los valores de  $d_{dfs}$  a un campo determinado se pueden calcular si se posee un modelo estructural, puesto que dependen del tiempo de correlación,  $\tau_c$ , y de propiedades de difusión de la molécula. Cuando la molécula presenta un modelo de difusión rotacional anisotrópico axial, como es el caso de la calbindina<sup>219</sup>, el valor de  $d_{dfs}$  para cada núcleo  $^{15}\text{N}$  viene dado por la expresión<sup>444</sup>:

$$d_{dfs} = \frac{S^2}{40p^3} h(\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp}) \frac{g_N g_H}{r_{\text{HN}}^3} \left[ \frac{(3 \cos^2 h_D - 1)(3 \cos^2 h_C - 1)}{1 + (g_N B_0 \tau_1)^{-2}} + \frac{12 \cosh_D \cosh_C \sinh_D \sinh_C \cos(\phi_D - \phi_C)}{1 + (g_N B_0 \tau_2)^{-2}} + \frac{3 \sin^2 h_D \sin^2 h_C \cos(2\phi_D - 2\phi_C)}{1 + (g_N B_0 \tau_3)^{-2}} \right] \quad [25]$$

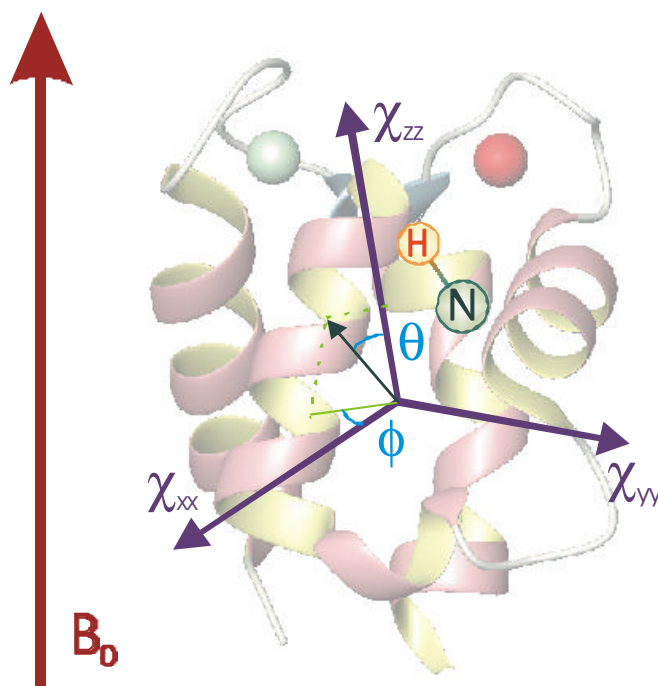
donde  $\tau_1 = (6D_{\perp})^{-1}$ ,  $\tau_2 = (D_{\parallel} + 5D_{\perp})^{-1}$ ,  $\tau_3 = (4D_{\parallel} + 2D_{\perp})^{-1}$ , siendo  $D_{\parallel}$  y  $D_{\perp}$  las componentes paralela y perpendicular del tensor de difusión rotacional de simetría axial de la molécula;  $\sigma_{\parallel}$  y  $\sigma_{\perp}$  son las componentes paralela y perpendicular del tensor de anisotropía del desplazamiento químico;  $\eta_D$  es el ángulo formado por el enlace N-H y el eje principal del tensor de difusión;  $\eta_C$  es el ángulo formado por el tensor simétrico y axial de la *csa* y el tensor de difusión; la diferencia  $\phi_D - \phi_C$  representa el ángulo formado por las proyecciones de los ejes principales de los tensores dipolares y de *csa*, sobre el plano perpendicular al eje principal del tensor de difusión;  $r_{\text{HN}}$  es la distancia internuclear H-N (1.02 Å);  $B_0$  es el campo magnético externo; y  $S^2$  es el parámetro de orden generalizado. El cálculo del desplazamiento de la frecuencia dinámica para la calbindina se llevó a cabo en el laboratorio de Florencia en un estudio previo al nuestro<sup>219</sup>.

## 2.2. Tensor de Susceptibilidad Magnética Molecular

Si tenemos un par N-H con una determinada orientación respecto al tensor de anisotropía magnética molecular,  $\mathbf{c}^{mol}$ , tal y cómo se indica en la Figura 22, el valor esperado para los  $rdc$  viene dado por la expresión<sup>59,474</sup>:

$$rdc = -\frac{B_0^2 g_H g_N h}{240 p^3 k T r_{HN}^3} \left[ \Delta c_{ax}^{mol} (3 \cos^2 q - 1) + \frac{3}{2} \Delta c_{rh}^{mol} (\sin^2 q \cos 2f) \right] \quad [26]$$

donde  $\Delta c_{ax}^{mol}$  y  $\Delta c_{rh}^{mol}$  son las componentes axial y rómbica del tensor de susceptibilidad molecular,  $\mathbf{c}^{mol}$ , y  $q$  y  $f$  son las coordenadas cilíndricas que describen la orientación del vector de enlace N-H con respecto a los ejes principales del tensor  $\mathbf{c}^{mol}$ ;  $r_{HN}$  es la longitud del enlace N-H (Figura 22).



**Figura 22.** Proteína orientada en un campo magnético. Se muestran los ejes principales del tensor de susceptibilidad magnética molecular,  $\chi^{mol}$ , y la orientación de un par  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  con respecto al mismo.

En la ecuación 26 podemos utilizar los valores de  $\Delta rdc$  si sustituimos también los valores de  $B_0^2$  por  $\Delta B_0^2$ . Luego el conocimiento de las diferencias de los acoplamiento dipolares residuales, obtenidos de acuerdo con la ecuación 24, de un conjunto de pares N-H nos dan información

## II. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

---

estructural, a través de la ecuación 26, de la orientación de este par con respecto al tensor de anisotropía magnética.

## 3. Dinámica de Proteínas

### 3.1. Consideraciones Teóricas

La relajación de un determinado núcleo de una molécula sometida a un campo magnético se debe a las fluctuaciones de los dipolos magnéticos que rodean a ese núcleo. En disolución, la velocidad de estas fluctuaciones son consecuencia tanto del movimiento de rotación general de la molécula, como de los movimientos internos. Por lo tanto, la relajación en disolución depende intrínsecamente de la dinámica de los núcleos y, en consecuencia, proporcionan una información muy valiosa de la movilidad de cada residuo.

Basándonos en razones de sensibilidad, podríamos considerar que el  $^1\text{H}$  es el núcleo más adecuado para el estudio de las propiedades dinámicas de una molécula. Sin embargo, la relajación del protón es el resultado de la suma de interacciones de magnitudes comparables, por lo que el análisis de las mismas en términos de dinámica interna es muy complicado. Por el contrario, los mecanismos de relajación de los núcleos de  $^{15}\text{N}$  en una proteína enriquecida uniformemente con este heteronúcleo son mucho más simples de predecir. Estos mecanismos son sólo dos: la anisotropía del desplazamiento químico,  $CSA$ , del núcleo de  $^{15}\text{N}$ , y el acoplamiento dipolar con su protón amida. Estos efectos son esencialmente constantes entre los protones del esqueleto de la proteína y, en principio, dependen únicamente de la movilidad interna de cada uno de estos átomos del esqueleto en el marco molecular. Así, el núcleo  $^{15}\text{N}$  se revela como ideal para el estudio de la dinámica interna de proteínas.

Una situación intermedia se produce en la relajación de los núcleos de  $^{13}\text{C}$  en una muestra doblemente etiquetada ( $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ ). Tomemos, como ejemplo, el caso de un núcleo de  $^{13}\text{C}\alpha$ . En este caso, la principal fuente de relajación es el acoplamiento dipolar de este núcleo con su protón  $\text{H}\alpha$ . Sin embargo, no se pueden ignorar los acoplamientos con los núcleos de carbono a los que está covalentemente unido ( $\text{C}'$ ,  $\text{C}\beta$ ). La situación se simplifica en el caso de carbonos cuaternarios como los carbonilos del esqueleto<sup>475</sup>,  $^{13}\text{C}'$ . La relajación aquí está dominada esencialmente por el fuerte acoplamiento con el carbono- $\alpha$ ,  $^1J_{\text{C}-\text{C}\alpha}$ , y por la anisotropía del desplazamiento químico del  $^{13}\text{C}'$ . Por lo tanto, la situación no es muy distinta de la que se produce en la relajación de los núcleos de  $^{15}\text{N}$ . No obstante, el uso de carbono-13 está menos extendido que el de nitrógeno-15 debido tanto a que

la adquisición y análisis de los resultados son más complejos como a los elevados costes de los reactivos marcados con  $^{13}\text{C}$ .

Desde un punto de vista experimental, para obtener esta información dinámica, necesitamos determinar las velocidades de relajación longitudinal y transversal ( $R_1$  y  $R_2$ ) de los núcleos de  $^{15}\text{N}$ . Es necesario también medir la relajación cruzada que tiene lugar entre los espines de  $^1\text{H}$  y  $^{15}\text{N}$ , es decir, el efecto nuclear Overhauser (NOE) entre ambos núcleos.

Los parámetros de relajación de los núcleos de  $^{15}\text{N}$  ( $R_1$ ,  $R_2$  y NOE  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ) proporcionan indicaciones de la movilidad relativa de cada núcleo sin necesidad de realizar un análisis adicional. Por ejemplo, velocidades de relajación,  $R_1$  y  $R_2$ , pequeñas con respecto al valor medio en una proteína (y, en general, en macromoléculas con peso molecular mayor de 3 KDa) son indicativas de movilidad local en la escala de tiempos de pico- a nanosegundos. Valores de NOE  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  pequeños, o incluso negativos, señalan el mismo tipo de dinámica en la región estudiada. Por el contrario, si las velocidades de relajación transversales son significativamente mayores que el valor medio, esa región presentará movilidad en la escala de tiempos de micro- a milisegundos.

Además de la información cualitativa, a partir de los parámetros de relajación de  $^{15}\text{N}$  se puede estudiar cuantitativamente la dinámica del esqueleto de la proteína<sup>476,477</sup>. Las ecuaciones siguientes describen la magnitud de la relajación dipolar  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  así como la del efecto NOE  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ <sup>476,477</sup>:

$$R_1(^{15}\text{N}) = A r_{\text{HN}}^{-3} f_1(\mathbf{v}_\text{H}, \mathbf{v}_\text{N}) \quad [27]$$

$$R_2(^{15}\text{N}) = B r_{\text{HN}}^{-3} f_2(\mathbf{v}_0, \mathbf{v}_\text{H}, \mathbf{v}_\text{N}) + R_{\text{ex}} \quad [28]$$

$$\text{NOE}(^1\text{H}-^{15}\text{N}) = 1 + C r_{\text{HN}}^{-3} f_3(\mathbf{v}_\text{H}, \mathbf{v}_\text{N}) \quad [29]$$

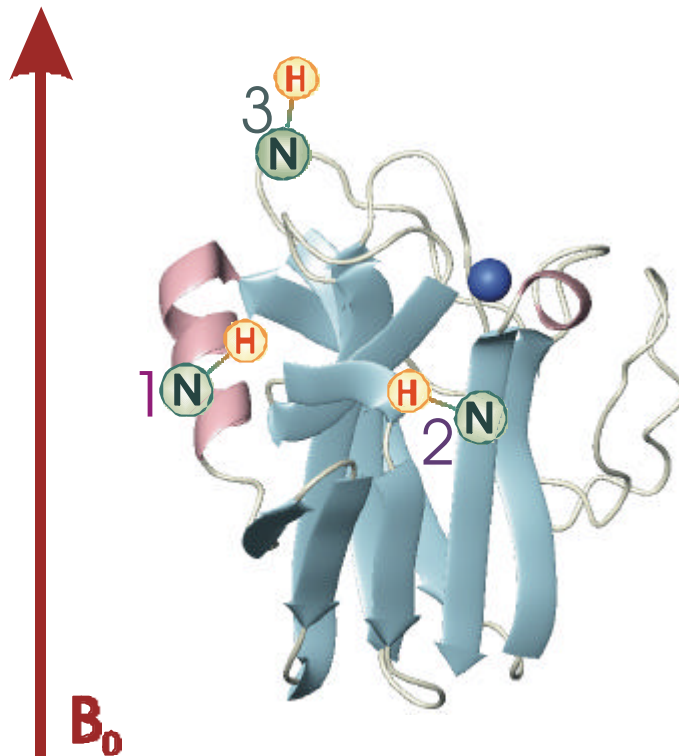
donde  $A$ ,  $B$  y  $C$  son constantes conocidas,  $r_{\text{HN}}$  es la distancia  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (1.02 Å), el término  $R_{\text{ex}}$  (ecuación 28) hace referencia a los procesos de intercambio (en las escala de tiempos de micro- a milisegundos) y las funciones  $f_i$  (con  $i = 1, 2, 3$ ) son combinaciones lineares de las denominadas funciones de densidad espectral,  $J(\mathbf{v})$ . Por lo tanto, las medidas de estos parámetros de relajación ( $R_1$ ,  $R_2$  y NOE  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ) proporcionan una descripción detallada de la función de densidad espectral del par N-H.

El campo magnético observado por un núcleo  $^{15}\text{N}$ , debido a sus protones vecinos, fluctúa a causa del movimiento de rotación de toda la proteína y de los movimientos locales (Figura 23). La función de densidad espectral describe cómo afectan las fluctuaciones de diferentes frecuencias a la relajación de un núcleo dado. La contribución que un campo fluctuante de una determinada frecuencia  $\omega$  proporciona a la relajación nuclear depende también de los movimientos moleculares globales según la siguiente ecuación<sup>478,479</sup>:



$$J(\mathbf{v}) = \frac{\tau_c}{1 + \mathbf{v}^2 \tau_c^2} \quad [30]$$

donde  $\tau_c$  es el tiempo de correlación para el movimiento considerado.



**Figura 23.** Representación de tres pares N-H pertenecientes a diferentes elementos de estructura secundaria de una proteína. Los pares 1 y 2 que se encuentran en una hélice- $\alpha$  y una hebra- $\beta$  respectivamente, probablemente presenten un  $\tau_c$  igual a  $\tau_r$ . Mientras que el par N-H perteneciente a un lazo (par 3) probablemente sea más móvil y tenga un  $\tau_c$  distinto de  $\tau_r$ .

### 3.2. Análisis Model-free

Para diferenciar entre los movimientos internos y los globales, debidos estos últimos a la rotación molecular, en la función de densidad espectral se suele discernir entre estos dos tipos de movimientos con tiempos de correlación diferentes. Lipari y Szabo desarrollaron un modelo de análisis (*model-free*)<sup>478,479</sup> en el que se describen los movimientos internos rápidos mediante dos

parámetros: el parámetro de orden generalizado,  $S^2$ , que informa sobre la amplitud del movimiento; y el tiempo de correlación efectivo,  $\tau_c$ . Según este modelo *model-free*, propuesto por Lipari y Szabo, la función de densidad espectral es la suma de esas dos contribuciones:

$$J(\mathbf{v}) = \frac{2}{5} \left[ \frac{S^2 \tau_r}{1 + (\mathbf{v} \tau_r)^2} + \frac{(1 - S^2) \tau_c}{1 + (\mathbf{v} \tau_c)^2} \right] \quad [31]$$

donde  $\tau_r$  es el tiempo de correlación para el movimiento de rotación de la molécula completa y  $\tau_c^{-1} = \tau_r^{-1} + \tau_e^{-1}$ , siendo  $\tau_e$  el tiempo de correlación para los movimientos internos.  $S^2$  se define como el parámetro de orden generalizado. Puede adoptar valores del 0 al 1. Un valor cero indica que el movimiento de ese par N-H es completamente libre (isotrópico). Un par N-H con valor de 1 para el  $S^2$  presentará un movimiento completamente restringido y anisotrópico. Cuando un par N-H gira acompañando el movimiento de rotación de la molécula, por ejemplo, cuando este par se encuentra fijo por el plegamiento de la proteína (como suele ocurrir en el caso de protones presentes en un barril- $\beta$  o en subestructura de hélice- $\alpha$ , Figura 23)  $\tau_c = \tau_r$ . En este supuesto el segundo término de la ecuación 31 se hace despreciable. Cuando el residuo posee su propio movimiento  $\tau_c \ll \tau_r$ , el parámetro  $S^2$  proporciona una estimación cuantitativa del grado de movimientos locales y la escala de tiempo de estos movimientos ( $\tau_e$ ) se puede obtener a partir de estas medidas. Éste es normalmente el caso de los lazos o de las regiones poco estructuradas de las proteínas (Figura 23).

Palmer y sus colaboradores<sup>477,480</sup> han desarrollado un procedimiento, basado en métodos estadísticos, según el cuál clasifican el comportamiento dinámico de cada par N-H ( $R_1$ ,  $R_2$ , NOE  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ) en cinco grupos diferentes.

El protocolo a seguir consta de las siguientes etapas:

- **Elección de un modelo de difusión rotacional para la proteína.** Si se posee un modelo estructural para la molécula estudiada, se puede definir un tensor de difusión rotacional a partir de los datos de relajación  $R_2/R_1$  para el conjunto de espines de la molécula que no presenten intercambio químico y cuya movilidad interna sea restringida. Estos datos experimentales se pueden ajustar a tres modelos de difusión diferentes: isotrópico, axialmente simétrico o completamente anisotrópico. El modelo isotrópico explica el movimiento global de la molécula con un solo parámetro, el coeficiente de difusión de la proteína,  $D_{\text{iso}}$ , relacionado directamente con el tiempo de correlación de la proteína,  $D_{\text{iso}} = (6 \times \tau_r)^{-1}$ . El modelo axialmente asimétrico utiliza, además del parámetro  $D_{\parallel}$  (equivalente al  $D_{\text{iso}}$ ), un parámetro de difusión anisotrópico ( $D_{\perp}$ ) y dos ángulos ( $\mathbf{q}$  y  $\mathbf{f}$ ) que definen la orientación del vector N-H con respecto al tensor de difusión. En el modelo totalmente anisotrópico, seis son los parámetros del ajuste,  $D_{\text{iso}}$ ,  $2D_{zz}/(D_{xx} + D_{yy})$ ,  $D_{xx}/D_{yy}$ , y tres ángulos ( $\mathbf{q}$ ,  $\mathbf{f}$  y  $\mathbf{y}$ ) que definen la orientación del vector N-H con respecto a las tres coordenadas principales del tensor de difusión. El mejor ajuste, teniendo en

cuenta el incremento de parámetros mediante el parámetro estadístico  $F$  (test-F)<sup>481,482</sup> corresponderá al tipo de movimiento esperado para la proteína completa.

- **Ajuste de cada par N-H al modelo seleccionado.** Una vez elegido el tipo de tensor de difusión, podremos discriminar entre, por un lado, los pares N-H cuyos parámetros de relajación experimentales estén de acuerdo con el movimiento global de la molécula y su posición respecto al tensor de difusión y, por otro, aquellos que no lo estén. A continuación se describen los cinco modelos propuestos<sup>476</sup>. En todos los modelos se ajusta el parámetro de orden generalizado. El Modelo 1 considera un único tiempo de correlación (el tiempo rotacional de la molécula,  $\tau_r$ , y ajusta sólo  $S^2$ ) y es válido para las parejas N-H sin movimientos internos, por ejemplo, las que se mueven con la totalidad de la proteína. El Modelo 2 añade al ajuste un tiempo de correlación ( $\tau_e$ ) que tiene en cuenta los movimientos internos rápidos (subnanosegundos) del propio residuo. El ajuste con el Modelo 3 utiliza sólo un tiempo de correlación total ( $\tau_r$ ), como el Modelo 1, pero se consideran los fenómenos de intercambio que tienen lugar en la escala de tiempo de micro- a milisegundos mediante un parámetro de velocidad de intercambio,  $R_{ex}$  (ecuación 28). El Modelo 4 es análogo al Modelo 2 (incluye el parámetro  $\tau_e$ ) y al Modelo 3 (incluye también el parámetro que cuantifica los fenómenos de intercambio,  $R_{ex}$ ). Finalmente, el Modelo 5 introduce un segundo parámetro de orden  $S_f^2$  y utiliza una expresión para la función de densidad espectral más compleja que la ecuación 31. Este modelo sirve para explicar el movimiento de pares N-H cuya función de autocorrelación no se puede aproximar a una exponencial simple de acuerdo con el modelo de Lipari y Szabo, sino que requiere al menos dos de estas funciones exponenciales<sup>483</sup>.

### 3.3. Dinámica Lenta de Proteínas

Los movimientos de la proteína en la escala de tiempos de micro/milisegundos suelen ser debidos a procesos de intercambio químico o conformacional. La contribución de los procesos de intercambio químico a la velocidad de relajación transversal en macromoléculas se determina, bien mediante experimentos del tipo Carr-Purcell-Meiboom-Gill, CPMG (Figura 31)<sup>484-486</sup>, o bien mediante la determinación del tiempo de relajación longitudinal cuando se aplican radiofrecuencias del tipo *spin lock*,  $R_{1\rho}$ <sup>487,488</sup>. La información que se obtiene de estos dos experimentos es equivalente. Nosotros hemos empleado la primera aproximación.

En el Capítulo correspondiente de Materiales y Métodos (Capítulo 2) se describe la secuencia de pulsos CPMG utilizada. Mediante esta secuencia de pulsos se determina el valor del tiempo de relajación transversal,  $R_2$ , para un valor de  $\tau_{cp}$  determinado. Si realizamos una serie de experimentos

a distintos valores de  $\tau_{cp}$ , determinaremos una función  $R_2$  dependiente de  $1/\tau_{cp}$  y denominada dispersión de relajación transversal,  $R_2(1/\tau_{cp})$ .

Consideremos el equilibrio de canje de un núcleo entre dos sitios  $A$  y  $B$ .



donde  $k_1$  es la constante cinética de primer orden para el proceso directo y  $k_{-1}$  es la constante análoga para el proceso inverso.

Si definimos  $k_{ex} = k_1 + k_{-1}$  y  $\Delta\omega$  como la diferencia, en hertzios, entre los desplazamientos químicos de la señal en los dos entornos, se considera regimen de canje rápido si  $k_{ex} > \Delta\omega$  y canje lento si se cumple la condición opuesta.

En régimen de canje rápido, la función de dispersión  $R_2(1/\tau_{cp})$  viene dada por<sup>489</sup>:

$$R_2(1/\tau_{cp}) = R_2(1/\tau_{cp} \rightarrow \infty) + R_{ex} \left[ 1 - \frac{2 \tanh(k_{ex} \tau_{cp} / 2)}{k_{ex} \tau_{cp}} \right] \quad [33]$$

donde  $R_{ex}$  es la velocidad de canje entre las dos conformaciones y  $R_2(1/\tau_{cp} \rightarrow \infty)$  es el valor de  $R_2$  para  $\tau_{cp} = 0$ . Cuando no existe canje,  $R_{ex} = 0$  y  $R_2(1/\tau_{cp})$ , no varía con el  $\tau_{cp}$ . En el caso de que exista cambio conformacional, a partir de esta ecuación, puede obtenerse la velocidad de canje.

Una expresión más compleja se obtiene en el caso de canje lento ( $k_{ex} < \Delta\omega$ )<sup>486</sup>. Según esta otra expresión, el valor de  $R_2(1/\tau_{cp})$  también es constante si no existe cambio conformacional.

### 3.4. Velocidades de Correlación Cruzada y Movilidad

Existe un parámetro de RMN diferente a los comentados hasta ahora que también proporciona información sobre las propiedades dinámicas del esqueleto de una proteína. Se trata de la velocidad de correlación cruzada<sup>490</sup>,  $CCR$ , entre los dos mecanismos principales de relajación de un núcleo de  $^{15}\text{N}$  del esqueleto de una proteína: la interacción dipolar con su protón unido y la  $CSA$  del propio núcleo  $^{15}\text{N}$ .

La interacción dipolar  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  ha sido descrita ampliamente en el apartado anterior. El desplazamiento químico es un parámetro intrínsecamente anisotrópico, es decir, depende de la dirección del dipolo magnético con respecto al campo magnético externo. En estado sólido, la  $CSA$  es una de las causas de la anchura de las señales y de la baja resolución de los espectros. En disolución, el movimiento molecular promedia este efecto y el valor observado es el desplazamiento

químico isotrópico, es decir, la traza del tensor de  $CSA$ . No obstante, la media observada en disolución se refiere sólo al valor de desplazamiento químico, puesto que la escala de tiempos del movimiento molecular es suficientemente rápida como para promediar el tensor. Sin embargo, el campo magnético que observa un núcleo de  $^{15}N$  mientras se relaja fluctúa debido a la  $CSA$  (y a la interacción dipolar con su  $^1H$  unido) y no se promedia con el movimiento molecular. En otras palabras, la diferente orientación de un núcleo de nitrógeno-15 con respecto al campo magnético (anisotropía) origina diferentes fuentes de relajación para cada uno de los núcleos. A este efecto se denomina relajación de la  $CSA$ .

Cálculos detallados muestran que la relajación inducida por la  $CSA$  es proporcional al cuadrado de la intensidad del campo magnético y a la anisotropía del desplazamiento<sup>490</sup>. El valor de esta anisotropía es proporcional al intervalo típico de desplazamientos químicos de los núcleos considerados. Así pues, la relajación debida a la  $CSA$  será importante para núcleos con intervalos de desplazamiento grandes y observables a campos magnéticos grandes. Normalmente es despreciable para protones.

Los dos tipos de relajación de los núcleos  $^{15}N$  están correlacionados. Efectivamente, por una parte, la relajación dipolar  $^1H$ - $^{15}N$  es diferente en función del estado de espín ( $\alpha$  o  $\beta$ ) del protón; por otro lado, el tensor  $CSA$  de  $^{15}N$  en los enlaces peptídicos es axialmente simétrico y su único eje forma un pequeño ángulo (entre 20-24°) con el vector del enlace N-H. Por lo tanto, el estado de espín del protón modifica el valor de la  $CSA$ . En consecuencia, la  $CSA$  también será diferente dependiendo del estado de espín del núcleo unido al nitrógeno. De hecho, los núcleos  $^{15}N$  unidos a protones en estado de espín  $\beta$  suman sus relajaciones dipolares y de  $CSA$ , mientras que para los núcleos unidos al estado de espín  $\alpha$  se substraen. Ambos componentes del doblete del nitrógeno relajan de forma muy diferente. Esta diferencia en relajación se llama velocidad de correlación cruzada ( $CCR$ ). El experimento CRINEPT<sup>58</sup> aprovecha este efecto para correlacionar un protón con su propio nitrógeno amida.

Ad Bax ha demostrado que las velocidades de correlación cruzada pueden relacionarse directamente con el parámetro de orden<sup>490</sup>,  $S^2$ . Así mismo, ha diseñado dos secuencias de pulsos muy similares que permiten determinar la diferencia y la suma de las velocidades de relajación de los dos tipos de núcleos  $^{15}N$ , según al estado de espín del protón al que se encuentren unidos (apartado 2.6 de Materiales y Métodos). A partir de estos datos es posible deducir la velocidad de correlación cruzada y, en consecuencia, la movilidad de cada grupo N-H (apartado 4.3 de Materiales y Métodos).



## III. Materiales y Métodos





# 1. Preparación de Muestras

## 1.1. Obtención de la Rusticianina

### a) *Cultivo de Escherichia coli*

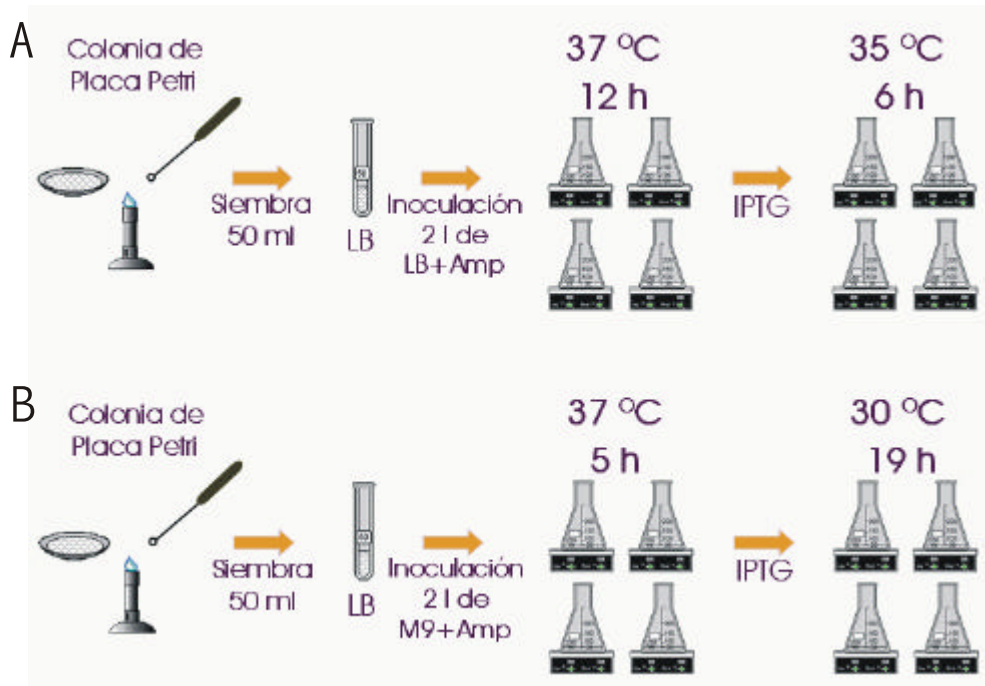
La rusticianina recombinante se obtuvo de la bacteria *Escherichia coli*, cepa BL21-(DE3), cedida por el profesor Samar S. Hasnain de De Monfort University (The Gateway, Leicester, Reino Unido). A continuación describimos el protocolo seguido para el cultivo de las bacterias y posterior purificación de la proteína<sup>368</sup>.

Las bacterias se cultivaban a 37 °C en condiciones aeróbicas, en medio LB cuando se preparaban las muestras de rusticianina no marcada (estudios de RMN de <sup>1</sup>H) y con medio M9, modificado ligeramente por nosotros, cuando se pretendía obtener una muestra de rusticianina marcada (con <sup>15</sup>N y/o <sup>13</sup>C).

En la Figura 24-A se describe gráficamente el proceso completo de obtención de Rc en medio LB. Se preparaban dos litros de este medio, consistente en peptona (20 g/l), extracto de levadura (10 g/l) y cloruro sódico (10 g/l) y se autoclavaba. A continuación se añadía ampicilina (200 µg/l). La cepa BL21-(DE3), transformada para la expresión de Rc, es resistente a este antibiótico. A partir de una colonia de bacterias de una placa Petri, se sembraban 50 ml de este medio con ampicilina y se incubaba durante doce horas, después de este tiempo, la colonia había crecido exponencialmente. Se inoculaban los 50 ml a 2 l de medio LB, siempre recién preparados y con antibiótico en la proporción adecuada. Estos 2 l estaban distribuidos en cuatro matraces erlenmeyers de 3 l de capacidad (500 ml de disolución en cada uno) para que la atmósfera del medio tuviera suficiente cantidad de oxígeno. De esta forma el crecimiento bacteriano es óptimo. A continuación se mantenía el cultivo en agitación constante durante doce horas. Todo el proceso de crecimiento se realizaba a 37 °C.

El medio M9 se preparaba a partir de cuatro disoluciones que debían ser autoclavadas de manera independiente (Figura 24-B) para evitar la precipitación de las sales y que la glucosa se caramelizase. La primera disolución (400 ml) contenía glucosa (marcada con <sup>13</sup>C en su caso). La segunda disolución (1600 ml) contenía las sales KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaCl y <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl. La tercera y la

cuarta constaban respectivamente, de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CaCl}_2$ , siendo sus volúmenes despreciables. Una vez autoclavadas, se repartían equitativamente entre cuatro matraces erlenmeyers de 3 l de capacidad (500 ml de disolución mezcla en cada uno de ellos). Las concentraciones finales de cada reactivo por litro de cultivo eran: glucosa, 8 g/l;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20.0 g/l;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 18.2 g/l;  $\text{NaCl}$  1.0 g/l,  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  1.0 g/l;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 mM; y  $\text{CaCl}_2$ , 400  $\mu\text{M}$ . A continuación se añadía ampicilina (200  $\mu\text{g/l}$ ). El cultivo se mantenía en agitación durante 5 horas a 37 °C.



**Figura 24.** Esquema del procedimiento de cultivo de Rc en: A) medio LB; B) medio M9.

Para inducir la expresión de la proteína se utilizaba isopropil- $\beta$ -tiogalactopiranoóxido (IPTG) en una concentración de 0.34 mM. Una vez añadido al medio de cultivo, se mantenía la agitación durante seis horas a 35 °C, en el caso de que el cultivo se hiciera en medio LB, o diecinueve horas a 30 °C, cuando el medio era M9. El IPTG es un agente promotor de la expresión de la rusticianina. Se une a un gen de DNA diseñado para la unión de este azúcar. Cuando se produce esta unión, la bacteria expresa la proteína. Cuando se añadía el IPTG, se descendía la temperatura para disminuir la actividad de las proteasas, de modo que la proteína producida no fuera digerida por la propia bacteria. Por otra parte, el descenso de la temperatura permite la expresión de la proteína a una velocidad lo suficientemente lenta como para que se pueda plegar correctamente. De esta forma, la proteína adopta la estructura terciaria adecuada sin que se

produzcan cuerpos de inclusión. Transcurrido el tiempo necesario para la expresión de la proteína, se recogían las células por centrifugación (4400 *g*, 20 min). En un cultivo típico de LB se obtenían unos 11 gramos de bacterias por cada litro de cultivo. Cuando el medio era M9, el rendimiento descendía a 8-9 gramos. Las células podían conservarse a -20 °C o emplearse inmediatamente en la extracción de la proteína.

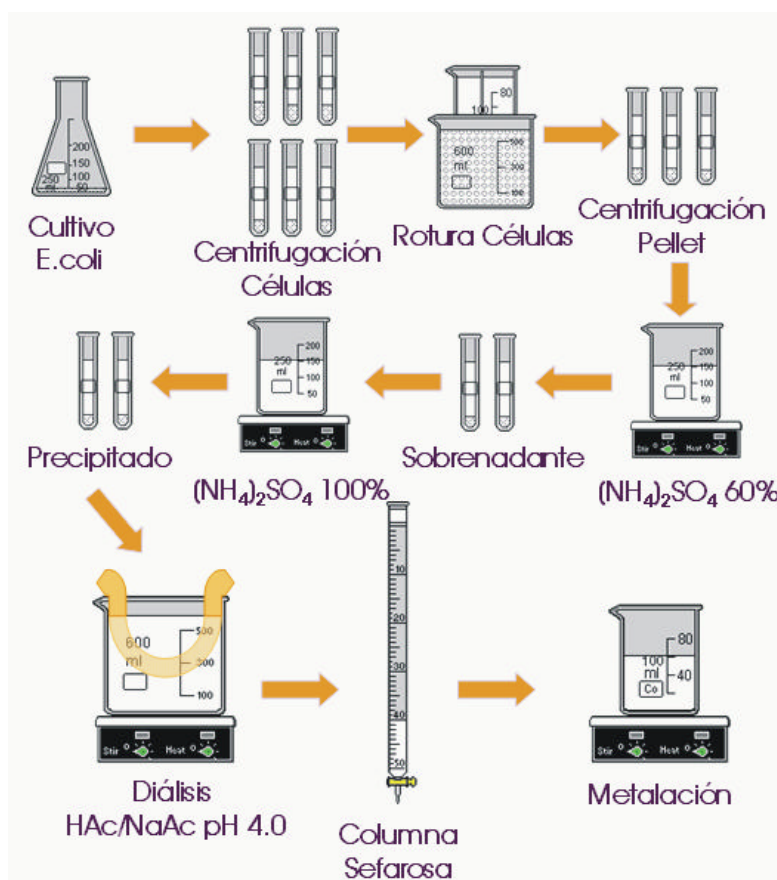
Todos los reactivos utilizados en el proceso de crecimiento de *E. coli* eran de la marca Cultmed de calidad purísima. La ampicilina y el IPTG eran de Sigma. Los reactivos marcados para el medio M9 eran suministrados por Cortec. En el resto de los experimentos de esta Tesis siempre se utilizaron reactivos Sigma o Panreac de calidad analítica.

### *b) Extracción y purificación de la proteína*

En la Figura 25 se detalla todo el proceso de purificación de la rusticianina. Las células de *E. coli* se resuspendían en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM. A continuación se provocaba la rotura de las membranas celulares mediante la aplicación de ultrasonidos (MSE Sonipep 150). Se realizaban cinco ciclos de 15 s en continuo y otros tantos de 27 pulsos discontinuos. La suspensión se centrifugaba a 15000 *g* durante 10 min para eliminar las membranas bacterianas. El precipitado resultante de esta centrifugación se eliminaba. Al sobrenadante recuperado se añadía (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hasta una saturación del 60 % (361 g/l). La disolución se mantenía en agitación durante una hora a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se centrifugaba durante 15 min a 39000 *g*, recogiendo el sobrenadante. Sobre éste se añadía (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hasta la saturación (279 g/l adicionales). Se volvía a dejar una hora en agitación a 4 °C y se centrifugaba a 3900 *g* durante 60 min. Esta vez se recogía la fase sólida. El pellet resultante se resuspendía en una disolución de acetato sódico (pH 4.0, 100 mM) y se dializaba toda la noche frente al mismo tampón a 4 °C.

La purificación de la proteína se concluía con la utilización de una columna de SP-Sefarosa de flujo rápido, empaquetada en tampón acetato (pH 4.0, 100 mM). Se utilizaba un gradiente de NaCl (0.25-0.45 M) como fase móvil. La fracción de la proteína salía en el intervalo de concentración de 0.3-0.4 M de sal. Habitualmente se obtenían unos 80 mg de proteína por litro de cultivo LB, y entre 60 y 70 mg cuando el cultivo se hacía con medio M9.

Para estimar el grado de pureza en los diversos pasos de la purificación se medía la absorbancia a 280 nm ( $\epsilon = 15700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). A continuación se añadía cobre(II) y ferricianuro (a concentraciones equimolares con la proteína) y se determinaba la absorbancia a 592 nm ( $\epsilon = 2100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). La relación  $A_{592}/A_{280}$  se utilizaba como índice de pureza, considerando un valor óptimo de 7.5.



**Figura 25.** Esquema del proceso de extracción y purificación de Rc.

### c) Metalación de la apoproteína

Para metalar la proteína con su metal nativo, cobre, la aporusticianina se diluía con tampón acético/acetato 0.1 M a pH 5.5 hasta una concentración de  $5 \times 10^{-5}$  M en proteína. La cinética de metalación en BCPs es muy dependiente del grado de desprotonación de las histidinas<sup>377</sup>. No obstante, en este caso, no era necesario subir excesivamente el pH, debido a la alta afinidad de Rc por su metal nativo. A continuación se añadía cobre(II) a la disolución hasta obtener una relación final entre las concentraciones molares de 1:20 (proteína:ion metálico). La metalación era, en estas condiciones, inmediata y se observaba a simple vista porque la disolución adquiría rápidamente la característica coloración azul.

Para obtener el derivado de cobalto, la aporusticianina se diluía con acetato sódico 0.1 M a pH 6.0-6.5 hasta una concentración de  $5 \times 10^{-5}$  M en proteína. Se añadía cobalto(II) hasta obtener

una relación final entre las concentraciones molares de apoproteína:cobalto de 1:20. La disolución resultante se mantenía dos o tres días en agitación constante a temperatura ambiente. De esta manera el grado de metalación de la apoproteína era superior al 90 %.

#### *d) Obtención de los mutantes de la rusticianina*

Los mutantes de rusticianina Met148Gln, Met148Glu, Met148Cys, Met148Lys y Met148Leu fueron obtenidos por el doctor John F. Hall de De Monfort University (The Gateway, Leicester, Reino Unido) mediante mutagénesis dirigida<sup>491</sup>. Tanto el cultivo de las bacterias, cepas BL21-(DE3) y XL-2 Blue de *E. coli*, como la purificación de las proteínas fue realizada por el doctor John F. Hall, asistido por esta doctoranda durante una estancia en su laboratorio (The Cell Signalling Laboratory, De Monfort University, Leicester, UK). El protocolo seguido es análogo al explicado anteriormente en este Capítulo.

Los mutantes nos los proporcionaron con su ion nativo, es decir, en forma de CuRc. Para obtener el derivado de cobalto del mutante Gln148Met Rc (Capítulo 3 de Resultados) se debía, por lo tanto, proceder primero a la desmetalación de la proteína. Este proceso se realizó mediante diálisis frente a una disolución de cianuro potásico 0.1 M en tampón fosfato a pH 9.0. Todo el tratamiento con el agente quelante se realizaba en vitrina de gases. La disolución se mantenía en agitación durante treinta minutos. Transcurrido este tiempo, la muestra perdía completamente el color azul que posee este mutante de rusticianina. Posteriormente se procedía al lavado, siempre por diálisis, de las muestras con una disolución de acetato sódico 100 mM a pH 6.8. Los lavados se continuaban durante dos días. A continuación se procedía a la rotura de la membrana de diálisis y a la metalación con cobalto(II), tal y como se ha indicado para la proteína nativa.

#### *e) Preparación de las muestras para los estudios de RMN*

Las muestras de cobalto(II)rusticianina (Capítulos 1 y 3 de Resultados) se concentraban en centricons de Millipore, hasta una concentración 3-4 mM en proteína que es la concentración mínima necesaria para la realización de los correspondientes experimentos de RMN en un sistema de cobalto(II). En este proceso se lavaban las muestras hasta pH 6.0. Si se requería una muestra en D<sub>2</sub>O, se procedía a más de seis lavados en los mismos concentradores con tampón acetato 100 mM, al mismo pH, utilizando agua deuterada. A las muestras en H<sub>2</sub>O se les añadía una cantidad de D<sub>2</sub>O equivalente al 5 % del volumen, necesaria para ajustar el *lock* de espectrómetro.

El volumen de las muestras de cobre(II)rusticianina (Capítulos 2 y 3 de Resultados) se reducía mediante centricons de Millipore, hasta una concentración final de 5-6 mM. Para la realización de experimentos de RMN de <sup>1</sup>H en sistemas de cobre(II), por los factores descritos en la Introducción (apartados 2.5 y 3.4), el factor sensibilidad es crítico. Por este motivo se intentaba concentrar las muestras al máximo posible. En este proceso de concentración se lavaban las

muestras, siempre con disolución tampón acetato 100 mM a pH 5.5. Si se requería una muestra en D<sub>2</sub>O, se procedía a más de seis lavados en los mismos concentradores con tampón acetato 100 mM, al mismo pH, pero, obviamente, en agua deuterada. Para los experimentos de transferencia de saturación es necesario que exista en disolución una pequeña cantidad ( $\leq 5\%$  del total de la proteína) de proteína reducida, Cu(I)Rc. Para ello se añadía la cantidad necesaria de reductor (ditionito sódico, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>).

Para los estudios de movilidad la proteína marcada con <sup>15</sup>N (Capítulo 4 de Resultados), se metalaba con cobre en las condiciones previamente descritas. Para preparar las muestras de proteína reducida, Cu(I)Rc, se añadía ditionito sódico ligeramente en exceso. Las muestras se concentraban típicamente hasta 3.0 mM. Para los estudios de relajación cruzada en función de la concentración (apartado 4.3 de Resultados), las muestras se prepararon por dilución. Se obtuvieron Cu(I)Rc y Cu(II)Rc a concentraciones 1.5 mM, 0.75 mM y 0.3 mM.

## **1.2. Obtención de la Calbindina D<sub>9k</sub>**

### *a) Cultivo y purificación de la proteína*

La expresión y purificación del mutante Pro43Met de la calbindina D<sub>9k</sub> bovina, en sus formas de calcio(II) y apo, fueron realizadas en el laboratorio de Florencia. Para ello se siguieron los protocolos previamente descritos en la bibliografía<sup>418,492</sup>. El sistema de expresión fue cedido generosamente al laboratorio de Florencia por el Profesor S. Forsén (Universidad de Lund). El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *E. coli* era M9, descrito en el apartado anterior.

La calbindina D<sub>9k</sub> posee una altísima afinidad por los iones calcio(II). Por ello la forma en que se obtenía siempre esta proteína era Ca<sub>2</sub>Cb.

### *b) Preparación de las muestras*

Las muestras de RMN se preparaban disolviendo la proteína liofilizada, bien en D<sub>2</sub>O, bien en una mezcla H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O en la proporción 90:10. La concentración final de CaCaCb era, típicamente, 2.0 mM.

La apo-Cb se preparaba mediante lavados sucesivos de la muestra de di-calcio calbindina con una disolución 0.5 mM de DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaclododecano-1,4,7,10-tetraacético). El agente quelante no se eliminaba a posteriori puesto que su presencia era necesaria para que el calcio del agua no ocupase los sitios metálicos de la proteína. No obstante, la concentración

remanente de DOTA era mínima y no afectaba a los espectros de RMN. La desmetalación de la calbindina se realizó durante los estudios de desnaturalización (Capítulo 6 de Resultados).

Las muestras de calbindina D<sub>9k</sub> metaladas con lantánidos (Capítulo 5 de Resultados) se preparaban mediante valoración bien de la Ca<sub>2</sub>Cb, o bien de la apo-Cb, con disoluciones 0.1 M del correspondiente cloruro del ion lantánido(III) deseado. El derivado de Ce<sup>3+</sup> se preparó añadiendo a la apoproteína alícuotas de una disolución de Ce<sub>2</sub>O<sub>3</sub> en HCl concentrado. La concentración final de las muestras era 1.0 mM en proteína. Como ya se ha explicado en la Introducción (Capítulo 4), el segundo sitio metálico de la calbindina es más afín a los lantánidos que el primero. Por lo tanto, cuando se añaden estos iones a la disolución, se obtienen metalo-derivados del tipo CaLnCb. Las valoraciones se siguieron mediante espectros monodimensionales de RMN de <sup>1</sup>H o mediante espectros bidimensionales HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N para el caso de las muestras marcadas con <sup>15</sup>N.

En los estudios de desnaturalización (Capítulo 6 de Resultados), las muestras de CaCaCb y CaCeCb se concentraban mediante concentradores centricon 3 (3.000 kDa de *cutoff*) hasta un volumen de 300 µl. Como agente desnaturalizante se utilizaba cloruro de guanidinio, GdmCl. Se preparaba una disolución 7 M en GdmCl en una mezcla H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O en la relación 9:1 y se ajustaba el pH a 6.0 mediante la adición de pequeñas cantidades de HCl o NaOH. Los efectos que el agente desnaturalizante causaba en la proteína se seguían mediante espectros 1D de RMN de <sup>1</sup>H dia- y paramagnéticos que se realizaban tras la adición de cada alícuota de las siguientes concentraciones de desnaturalizante: 0.20, 0.41, 0.80, 1.21, 1.65, 2.08 M.

## 2. Experimentos de RMN

En el presente Capítulo se detallan las secuencias de pulsos y los parámetros utilizados en los diferentes estudios de esta Tesis. La clasificación de las secuencias que aquí hemos realizado ha sido un tanto arbitraria, agrupándolas, fundamentalmente, sobre la base de la información que nos aporta cada una de ellas. Nos hemos detenido y hemos efectuado una descripción más profunda de aquellas secuencias de mayor relevancia en sistemas paramagnéticos y de las que tienen una especial importancia en el desarrollo de esta Tesis.

### 2.1. Experimentos Homonucleares de RMN

#### a) *Monodimensionales simples*

Como medida de control de la muestra, antes de realizar cualquier otro experimento RMN, siempre se hacía un experimento monodimensional en condiciones lentas (para observar todas las señales diamagnéticas de la proteína) y, en su caso, otro en condiciones rápidas (para observar las señales paramagnéticas). En todas las secuencias empleadas en este Capítulo, salvo que explícitamente se diga lo contrario, la frecuencia portadora se situaba siempre sobre la señal del agua. Los desplazamientos químicos de los protones vienen dados en partes por millón (ppm) con referencia al TMS (tetrametilsilano) a través de la señal del agua. A ésta se le asignaba su desplazamiento químico de acuerdo con la siguiente relación<sup>493</sup>:  $d_{HOD} = -0.012T + 5.11$ , donde  $d_{HOD}$  representa el desplazamiento químico en ppm de la señal del H<sub>2</sub>O y  $T$  es la temperatura en grados Celsius.

En los experimentos 1D diamagnéticos utilizábamos bien la presaturación<sup>494</sup>, o bien la secuencia de pulsos *watergate*<sup>495</sup> para la eliminación del agua. En ambos casos se adquirían 16K de puntos reales con una ventana típicamente de 20 ppm y 800 ms de tiempo de relajación entre cada acumulación. El número de acumulaciones variaba entre 8 y 32 en función de la concentración de la muestra. El tiempo entre pulsos en la secuencia *watergate* era de 100  $\mu$ s, lo que producía un primer nulo a 5000 Hz (14.7 ppm) de la frecuencia portadora en un espectrómetro de 500 MHz.



Para la observación de señales con relajación rápida se utilizaba, bien la secuencia *superweft* (apartado 2.6 de Introducción) o bien la secuencia desarrollada por nosotros, *invsuperweft* (apartado 1.1 de Resultados). Empleábamos la secuencia *superweft* en el caso de que las señales tuvieran grandes desplazamientos químicos (señales resueltas, típicamente a más de 15 ppm o menos de  $-2$  ppm), mientras que la secuencia *invsuperweft* se usaba para la detección de señales paramagnéticas cuyo desplazamiento experimental es pequeño (señales que se encuentran en la zona típicamente diamagnética).

Cuando se empleaba la secuencia *superweft*, se utilizaban, típicamente, valores de ventana espectral de 200 ppm, con 2048 puntos reales en la adquisición, lo que originaba tiempos de adquisición del orden de 10.3 ms. El valor del tiempo inter-pulsos  $d_2$  (Figura 6 de la Introducción) solía ser de 20 ms. Para la observación de señales más desplazadas de 100 ppm, como, por ejemplo, los protones Cys H $\beta$  en el derivado de Co(II)Rc, (Capítulo 1 de Resultados), se modificaba la posición de la frecuencia portadora hacia campos más bajos. En estos experimentos se procuraba que la señal diamagnética de la proteína no apareciera, por el efecto denominado *reflejo* (del inglés *foldng*), sobre las señales de interés.

Para el estudio del estado oxidado de la rusticianina, Cu(II)Rc (Capítulo 2 de Resultados), las condiciones del experimento eran ligeramente diferentes. Los experimentos se realizaron a un campo magnético de 18.8 T, es decir, a una frecuencia de 800.13 MHz para el protón. Se utilizó una sonda prototipo de 2.5 mm de detección de banda muy ancha, con una potencia de 1000 vatios y con un pulso de  $90^\circ$  de 2.0  $\mu$ s. La ventana espectral en estos casos era de 125 ppm, y se solían adquirir espectros de 2048 a 4096 puntos reales.

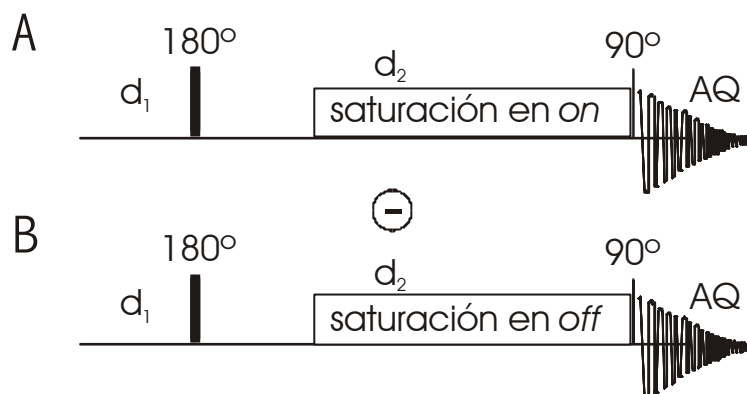
Para transformar los espectros más paramagnéticos se utilizan siempre anchuras de línea relativamente grandes (parámetro de *line-broadening*,  $lb$ , superior a 20, tanto mayor cuanto más anchas sean las señales).

Las velocidades de relajación longitudinales ( $R_1$ ) de protón se obtuvieron, en el caso de Co(II)Rc, utilizando la secuencia de pulsos *inversion-recovery*<sup>496</sup>. Los tiempos de recuperación variaban entre 0.1 y 300 ms en intervalos crecientes de tiempo.

### b) Determinación del efecto NOE

En la Figura 26 se muestra la secuencia utilizada en sistemas paramagnéticos para la realización de NOEs 1D. Se trata de la secuencia *superweft* (apartado 2.6 de Introducción), intercalando en el tiempo  $d_2$  una irradiación selectiva sobre la señal en cuestión (secuencia irradiación en *on*). La secuencia se repite irradiando a una frecuencia muy próxima a la de la señal (*off*), sin que ésta se vea alterada. De esta forma, las dos secuencias se adquieren en las condiciones lo más similares posibles. La diferencia de las dos adquisiciones nos da el NOE. Si el tiempo de saturación,  $d_2$ , es lo suficientemente largo, la señal irradiada llega al estado estacionario

y, entonces, el experimento realizado se denomina NOE 1D en estado estacionario (*steady-state* 1D NOE). La ventana espectral solía ser de 200 ppm, con tiempos de adquisición,  $d_1$  y  $d_2$  (Figura 26) de 30, 50 y 24 ms. El tiempo de irradiación era de 45 ms y las potencias variaban entre 0.2 y 0.6 vatios.



**Figura 26.** Secuencia *superweft* con irradiación durante el tiempo  $d_2$ ; A) Irradiación sobre la señal (*on*); B) Irradiación "cerca" de la señal (*off*). El efecto NOE 1D se obtiene por diferencia de los experimentos adquiridos utilizando las dos secuencias.

La determinación del NOE con la secuencia y los parámetros aquí descritos se ha utilizado en la caracterización del sistema de Co(II)Rc (Capítulo 1 de Resultados) y del derivado de cobalto de su mutante Met148Gln Rc (Capítulo 3 de Resultados). Así mismo la intensidad de los NOEs obtenidos mediante esta secuencia también se utilizaron como restricciones experimentales paramagnéticas en el cálculo de estructuras de la CaLnCb (Capítulo 5 de Resultados).

La secuencia de pulsos anterior permite, además de la observación del efecto NOE entre protones cercanos, discernir entre un mismo protón que se encuentra en dos entornos químicos diferentes, siempre que la velocidad de transferencia entre las dos especies sea la adecuada (apartado 2.6 de Introducción). Estos experimentos se denominan de transferencia de saturación. Las señales paramagnéticas correspondientes a los protones del sistema de Cu(II)Rc (Capítulo 2 de Resultados) y las de los mutantes en la metionina axial también de cobre(II) (Capítulo 3 de Resultados), fueron asignadas mediante este tipo de experimentos. En el caso de la detección de los protones  $H\beta$  de cisteína (NOEs *ciegos*, Capítulo 2 de Resultados) se irradiaba cada 50 (o 150 ppm) desde 40 hasta 1400 ppm (irradiación en *on*). La señal de referencia (irradiación en *off*) se tomaba simétrica respecto de la señal del  $H_2O$ . La potencia de irradiación se variaba entre 1 y 1.8 vatios para los experimentos de las señales más anchas (protones  $H\beta$  de Cys, Capítulo 2 de Resultados) y entre 0.002 y 0.2 w para el resto de las señales. La mayor potencia de irradiación está directamente relacionada con la anchura de las señales observadas: a mayor anchura, mayor potencia necesaria

para saturar la señal. En estos sistemas se utilizaban potencias mucho más altas puesto que las señales son mucho más anchas que en los sistemas de cobalto(II) (Tablas 8 y 14, Capítulos 1 y 2 de Resultados). El resto de los parámetros utilizados en estos experimentos eran análogos a los indicados en el apartado anterior.

### c) Experimentos bidimensionales

#### c.1) Basados en el acoplamiento dipolar

El experimento por excelencia para detectar acoplamientos dipolares es el NOESY<sup>132,497</sup>. En sistemas paramagnéticos se suele utilizar el WEFT-NOESY<sup>252</sup> (d<sub>1</sub>-P180-d<sub>2</sub>-NOESY, apartado 2.6 de Introducción) que elimina las señales que relajan lentamente. En los espectros basados en acoplamiento dipolar, el tiempo de mezcla se elige en concordancia con el  $T_1$  del protón que relaja más rápidamente. Los demás parámetros utilizados dependían de los desplazamientos químicos y de los  $T_2$  de las señales cuyos acoplamientos querían observarse. Cuanto más paramagnéticas son las señales a detectar, tanto más se acortan los tiempos y, en consecuencia, menor resolución habrá. No obstante, hay que tener en cuenta que la resolución es, en estos sistemas, intrínsecamente innecesaria. Efectivamente, por un lado, el número de señales paramagnéticas no es tan elevado como para que, en la mayoría de las ocasiones se produzca solapamiento. Por otra parte, las señales son muy anchas. El tiempo de reciclo puede hacerse muy corto (las señales paramagnéticas alcanzan su equilibrio con el campo magnético muy rápidamente) y, por lo tanto, se puede incrementar el número de acumulaciones lo máximo posible. Esto compensa parcialmente la pequeña intensidad de un pico entre protones que relajan rápidamente en un experimento NOESY, ya que la intensidad del pico es proporcional a los tiempos de relajación de las señales implicadas (apartado 2.5 de Introducción).

En los experimentos realizados en condiciones más rápidas para observar señales muy desplazadas (desde -30 hasta 120 ppm) y con tiempos de relajación muy cortos (entre 1 y 10 ms) se utilizaban ventanas espectrales de 200 ppm, tiempos de reciclo de entre 50 y 100 ms por acumulación y tiempos de mezcla de entre 2 y 15 ms. Para las señales con menor efecto paramagnético (menos desplazadas y con  $T_1$  más largos) típicamente se utilizaban ventanas espectrales de 40 ppm, tiempos de reciclo de 200-400 ms y tiempos de mezcla de entre 20 y 40 ms.

A la hora de transformar es necesario hacerlo realizando los primeros puntos de la FID, donde se encuentra toda la información de las señales paramagnéticas. Por ello, se elegían funciones de pesado como el seno cuadrado (desplazadas entre 45 y 60°) y también con cierto ensanchamiento de línea en las dos dimensiones. En los experimentos extremadamente paramagnéticos se llega incluso a transformar con menos puntos que los adquiridos (eligiendo sólo los 512 primeros en la dimensión de adquisición y los primeros 256 en la evolución).

Este tipo de experimentos se realizaron para los derivados de cobalto(II) de la rusticianina nativa y de su mutante Gln148Met Rc (Capítulos 1 y 3 de Resultados).

### c.2) *Basados en el acoplamiento escalar*

Para determinar los acoplamientos escalares homonucleares se llevaron a cabo experimentos TOCSY<sup>33</sup>. Si se añade la secuencia *superweft* a los pulsos originales, se obtiene el WEFT-TOCSY<sup>252</sup> (d<sub>1</sub>-P180-d<sub>2</sub>-TOCSY). Todos los parámetros de este experimento relacionados con los desplazamientos químicos, los acoplamientos y los tiempos de adquisición, se ajustaban de acuerdo con los valores obtenidos para los  $T_2$  de las señales observadas. Normalmente se elegía una ventana espectral de unos 40 ppm y un tiempo de *spin lock* de entre 20 y 50 ms.

## 2.2. **Experimentos Heteronucleares para la Detección y Asignación de Señales**

### a) *HSQC de <sup>15</sup>N y <sup>13</sup>C*

La secuencia de pulsos que hemos utilizado para obtener los picos de correlación cruzada protón-heteroátomo ha sido la denominada HSQC (*Heteronuclear Single-Quantum Correlation*)<sup>35</sup>. El heteroátomo es, en el caso de proteínas, <sup>13</sup>C o <sup>15</sup>N.

Los experimentos heteronucleares HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N se adquirían generalmente con 2048 × 256 puntos reales en las dimensiones de <sup>1</sup>H y <sup>15</sup>N, respectivamente. Se realizaban de 4 a 8 acumulaciones por FID. La ventana espectral utilizada para determinar las señales diamagnéticas solía ser de 13 (<sup>1</sup>H) y 30 (<sup>15</sup>N) ppm. Cuando se pretendía observar los protones Hε1 de los grupos imidazol de las histidinas, la ventana se aumentaba hasta 21 (<sup>1</sup>H) y 100 ppm (<sup>15</sup>N). La frecuencia portadora en la dimensión de adquisición se ajustaba a la del H<sub>2</sub>O en todos los casos, mientras que el centro de la ventana para la evolución era 119 ppm. El tiempo de transferencia de magnetización <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N (tiempo del *inept*)<sup>34</sup> utilizado era 5.5 ms, correspondiente a  $(2J_{HN})^{-1}$ , mientras que el tiempo de reciclo era generalmente 1 s. Durante la adquisición se desacoplaba el <sup>15</sup>N mediante la secuencia waltz-16 o garp.

En los espectros HSQC de <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C, la ventana espectral para el heteronúcleo solía ser 60 ppm, mientras que para el <sup>1</sup>H era 20 ppm. El tiempo de transferencia *inept* era de 3.3 ms, de acuerdo con la constante de acoplamiento <sup>1</sup>J<sub>HC</sub>.

Las FIDs se multiplicaban en ambas dimensiones por una función seno cuadrado desplazadas entre 45° y 60°, se extendían sus puntos mediante la adición de ceros (*zero-filling*)

hasta obtener matrices de  $2048 \times 1024$  puntos y se realizaba la transformada de Fourier en ambas dimensiones.

También se realizaron experimentos heteronucleares en sistemas paramagnéticos. Como se ha comentado previamente (apartado 2.4 de Introducción), los núcleos próximos a un centro paramagnético relajan muy rápidamente. Esta relajación es proporcional a la razón giromagnética de cada núcleo (ecuación 17). Por lo tanto, la pérdida de magnetización en cada tiempo usado en cualquier secuencia de pulsos es muy acusada para los protones ( $\gamma_H = 2.675 \times 10^8 \text{ T}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), menos para los núcleos de carbono-13 ( $\gamma_{13C} = 6.728 \times 10^7 \text{ T}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) y menos aún para el nitrógeno-15 ( $\gamma_{15N} = -2.713 \times 10^7 \text{ T}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). En consecuencia todos los tiempos deben acortarse, especialmente aquellos que impliquen a la magnetización del protón. Los tiempos de transferencia de magnetización del protón al heteronúcleo (*inept*) y viceversa (*inept re-enfocado*) se ajustaban de acuerdo con un tiempo del orden de la inversa de dos veces el  $T_2(^1\text{H})$ , y no con la inversa de  $2J_{HX}$ . Así acortábamos los tiempos de transferencia *inept* a 1.0 y 1.4 ms para los acoplamientos  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ , respectivamente. En estos experimentos paramagnéticos es innecesario un tiempo de reciclo largo y lo reducíamos a 300 ms. Por este motivo se puede incrementar el número de acumulaciones sin que el experimento dure un tiempo excesivamente largo.

En los experimentos bidimensionales paramagnéticos se deben evitar, en general, las secuencias con gradientes de pulsos, puesto que éstos utilizan siempre tiempos de recuperación durante los cuales se pierde magnetización. Por este motivo conviene eliminar la señal del  $\text{H}_2\text{O}$  mediante presaturación, ya que el uso de otras variantes (selección de coherencias que eviten la adquisición de esta señal) como las *echo-antiecho*<sup>498</sup> o la introducción de variantes del *watergate*<sup>495</sup> suelen disminuir la intensidad de los picos paramagnéticos. No obstante, al ser la eliminación de la señal del disolvente mediante la secuencia *echo-antiecho* extremadamente eficaz (mucho más que la presaturación), la ganancia que se puede introducir en estos experimentos es también bastante mayor, por lo que, en buena medida, se compensan los efectos.

Las transformadas de estos experimentos deben realizarse siempre teniendo en cuenta que la información se encuentra en los primeros puntos de la FID. Por lo tanto, se utilizan funciones de pesado que incrementen el peso de estos primeros puntos.

Experimentos HSQC se realizaron, obviamente, en todos los capítulos en los que trabajamos con heteronúcleos. En condiciones paramagnéticas, se realizaron en todos estos Capítulos excepto en el de la movilidad de  $R_c$  (Capítulo 4 de Resultados).

## b) $^{15}\text{N}$ HSQC-TOCSY

En un experimento 2D TOCSY se relacionan todos los protones que están magnéticamente relacionados entre sí, es decir, se determinan los denominados *sistemas de espin*<sup>33</sup>. En el experimento  $^{15}\text{N}$  HSQC-TOCSY se aprovecha la existencia de un heteronúcleo para incrementar la

resolución del experimento aumentando en una dimensión (la del núcleo de  $^{15}\text{N}$ ) el mismo. El resultado de este experimento es un cubo con dos dimensiones de  $^1\text{H}$  y una de  $^{15}\text{N}$ . Para cada plano de  $^{15}\text{N}$  se observan los protones del mismo aminoácido que el nitrógeno peptídico que aparece en el intervalo de desplazamientos químicos determinado por dicho plano.

Los experimentos  $^{15}\text{N}$  HSQC-TOCSY se adquirieron con 128, 64 y 2048 puntos reales en las dimensiones de  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  y  $^1\text{H}$ , respectivamente. Las ventanas espectrales utilizadas eran 13 ( $^1\text{H}$ ), 28 ( $^{15}\text{N}$ ) y 13 ( $^1\text{H}$ ) ppm. El centro de la ventana del  $^{15}\text{N}$  se definía a 119 ppm.

Este experimento se utilizó en el Capítulo sobre la movilidad de Rc (Capítulo 4 de Resultados) para resolver ambigüedades de asignación en los experimentos HSQC. Se realizó tanto para la rusticianina reducida como para la oxidada.

### c) HNCA

En un experimento HNCA<sup>499</sup> se observan picos de cruce entre el protón amídico de un aminoácido y los carbonos- $\alpha$  del mismo residuo y del anterior. La finalidad de este experimento es la asignación del esqueleto de la proteína.

Los experimentos tridimensionales HNCA se adquirieron con 128 ó 256, 40 ó 64 y 1024 ó 2048 puntos reales en las dimensiones de  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  y  $^1\text{H}$ , respectivamente. Las ventanas espectrales utilizadas eran 27 ( $^{13}\text{C}$ ), 28 ( $^{15}\text{N}$ ) y 13 ( $^1\text{H}$ ) ppm. El centro de la ventana del  $^{13}\text{C}$  se definía a 50 ppm.

También se realizaron experimentos HNCA en versión 2D eliminando la evolución del núcleo de  $^{15}\text{N}$ .

Este tipo de experimentos se realizó en el trabajo de la determinación de la estructura de la calbindina (Capítulo 5 de Resultados) para Ca<sub>2</sub>Cb y CaCeCb. También se llevaron a cabo HNCA bidimensionales en el trabajo de la movilidad de la rusticianina (Capítulo 4 de Resultados) para despejar incertidumbres en el caso de ambigüedad en la asignación de señales del HSQC.

En versión 2D, y para la asignación de algunos núcleos cercanos al tercer lazo (al que se une el ion lantánido) en la CaLnCb (Capítulo 5 de Resultados), se realizó un experimento HNCA en condiciones rápidas. Para la realización de este experimento se acortó el tiempo de transferencia de magnetización  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (como se ha comentado en el apartado anterior) y se incrementaba la velocidad de reciclo a  $2.1 \text{ s}^{-1}$ .

#### d) *HNCO*

En un experimento  $\text{HNCO}^{499}$  se observan picos de cruce entre el protón amídico y el carbono carbonílico del mismo residuo. Al igual que el experimento anterior, el  $\text{HNCO}$  se utiliza para asignar las señales del esqueleto de una proteína.

Los parámetros de estos experimentos eran análogos a los del  $\text{HNCA}$  respecto al protón y al nitrógeno-15. Lógicamente, la ventana de  $^{13}\text{C}$  se centraba a los desplazamientos químicos de los carbonos carbonílicos (178 ppm) y se estrechaba a 14 ppm. También se hicieron  $\text{HNCO}$  bidimensionales eliminando la evolución del  $^{15}\text{N}$ .

Hemos realizado  $\text{HNCO}$  tridimensionales durante la determinación de la estructura de la calbindina (Capítulo 5 de Resultados) para los dos metalo-derivados estudiados en el trabajo.

#### e) $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ *COSY*

Hemos realizado también experimentos orientados a la asignación de las cadenas laterales, como es el experimento  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  *COSY* en modo magnitud<sup>500</sup>. Se trata de un experimento bidimensional en el que las señales corresponden a los acoplamiento escalares entre carbonos. Los parámetros usados son los descritos por Bertini y colaboradores<sup>220</sup>.

#### f) *HCCH-TOCSY*

En el experimento original  $\text{HCCH-TOCSY 3D}^{501}$  la magnetización pasa del protón al  $^{13}\text{C}$ , aquí se produce un *TOCSY* de  $^{13}\text{C}$  y vuelve la magnetización al protón. Por lo tanto, en este experimento se relacionan protones y carbonos que están unidos covalentemente entre sí. Nosotros realizamos este tipo de experimentos en su versión 2D eliminando la última evolución del protón. En esta versión tenemos un plano  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  donde al desplazamiento químico de cada  $^{13}\text{C}$  se encuentran picos de cruce con los protones del mismo sistema de espín. Este experimento está orientado a la asignación de la cadena lateral de los aminoácidos.

Este experimento se adquirió con 1024 puntos reales para  $^1\text{H}$  y 160 para  $^{13}\text{C}$ . Las ventanas espectrales utilizadas eran de 36 ( $^1\text{H}$ ) y 70 ( $^{13}\text{C}$ ) ppm centradas a la frecuencia de resonancia del  $\text{H}_2\text{O}$  y a 40 ppm, respectivamente. Se realizaron 640 acumulaciones y el tiempo de reciclo era de 600 ms.

Esta secuencia se utilizó en el Capítulo del cálculo de la estructura de la calbindina (Capítulo 5 de Resultados).

## 2.3. Experimentos Heteronucleares que Proporcionan Restricciones en el Cálculo de Estructuras

### a) *Inversion-recovery HSQC*

Las velocidades de relajación longitudinal,  $R_1$ , de los núcleos cercanos a un centro paramagnético son inversamente proporcionales a la distancia de ese protón a dicho centro (ecuación 16). Por lo tanto, este parámetro nos revela información estructural en la proximidad del ion metálico. Para la determinación de los valores de  $R_1$  en el caso de los protones se utilizó la secuencia de pulsos bidimensional *inversion-recovery* HSQC<sup>458</sup>. Esta secuencia consiste en un HSQC al que se le antepone un pulso de  $180^\circ$  y un tiempo  $d_2$  (d1-P180-d2-HSQC). Al igual que en la secuencia *inversion-recovery* 1D<sup>496</sup>, variando el tiempo  $d_2$ , la intensidad del pico de cruce observado se modifica en función de la relajación del protón. En otras palabras, se trata de un experimento inversión-recuperación donde se aprovecha la resolución que proporciona un experimento 2D.

Se realizó este tipo de experimentos para protones unidos tanto a  $^{13}\text{C}$  como a  $^{15}\text{N}$ . Para determinar la  $R_1$  de protones no excesivamente cercanos al centro metálico, se utilizaban los parámetros de la secuencia HSQC descritos previamente (apartado 2.2). En este caso el tiempo de reciclo se aumentaba a 2 s para permitir la completa relajación de los protones. En el caso de protones muy cercanos al metal se acortaban los tiempos correspondientes tal y como se indica en el mismo apartado. Así mismo, se disminuía el tiempo de reciclo a 500 ms.

### b) *HNCO para determinar puentes de hidrógeno*

La constante escalar entre un núcleo de  $^{15}\text{N}$  y uno de  $^{13}\text{C}$  a tres enlaces ( $^3J_{\text{NCO}}$ ) constituye una evidencia directa de la presencia de enlaces por puente de hidrógeno. Este acoplamiento establece una conexión covalente entre el nitrógeno amídico y el carbono carbonílico de dos residuos que participan en un enlace de hidrógeno del tipo  $\text{N}-\text{H} \cdots \text{O}=\text{C}$ . Para detectar este acoplamiento escalar débil, puesto que se produce a través de un enlace de hidrógeno, se realiza un experimento HNCO<sup>442</sup> modificando el tiempo de transferencia de magnetización del nitrógeno al carbonilo. La constante  $^3J_{\text{NCO}}$  suele tener valores pequeños ( $J \approx 15 \text{ Hz}$ ), por lo que este tiempo debe ser lo suficientemente largo para que se produzca el acoplamiento (del orden de 133 ms). Realizamos un experimento HNCO bidimensional eliminando la evolución del nitrógeno. Los parámetros utilizados fueron los mismos que para el experimento HNCO tridimensional (apartado 2.2) pero cambiando el tiempo de la transferencia *inept* que se ajustaba, en este caso, a 66.6 ms.



c) *HNHA*

Mediante la secuencia de pulsos *HNHA*<sup>441</sup> se obtiene un experimento 3D en el que se observa el acoplamiento del protón amídico con su protón- $\alpha$ . En este experimento la dimensión del  $^{15}\text{N}$  se utiliza para obtener una mayor resolución. En el experimento 3D resultante el cociente entre la integral del pico y la integral de la diagonal es proporcional a la constante homonuclear de  $\text{HN-H}\alpha$ ,  $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ . Esta constante de acoplamiento  $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$  proporciona información del ángulo  $\theta$  del esqueleto de la proteína a partir de la ecuación de Karplus con los parámetros adecuados<sup>46</sup>.

d) *HNHB*

La secuencia *HNHB*<sup>436</sup> fue diseñada para la medida de la constante de acoplamiento homonuclear  $\text{HN-H}\beta$ ,  $^3J_{\text{HN-H}\beta}$ . La constante de acoplamiento se obtiene a partir de la relación de intensidades de los dos picos cruzados  $\text{HN-H}\beta$  del espectro. Esta constante de acoplamiento nos permite realizar la asignación estereoespecífica de los protones metilénicos,  $\text{H}\beta 1$  y  $\text{H}\beta 2$ .

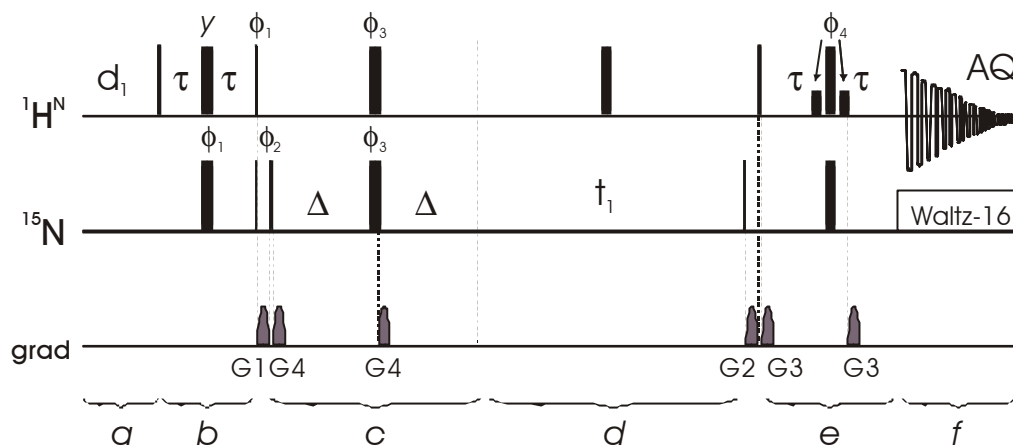
Todas las secuencias que proporcionan restricciones estructurales se han utilizado en la determinación de la estructura de la calbindina  $\text{D}_{9\text{k}}$  (Capítulo 5 de Resultados).

## 2.4. Determinación del Acoplamiento Dipolar Residual

La determinación de los acoplamientos dipolares (Capítulo 5 de Resultados) se realizó mediante la secuencia de pulsos  $^1\text{J}_{\text{N-H}}$ -modulated HSQC<sup>444</sup>. Se trata de la secuencia HSQC a la que se ha añadido un período de evolución adicional como se muestra en la Figura 27.

Para mayor claridad, hemos dividido esta secuencia en seis partes, cinco de ellas (*a, b, d, e, f*) corresponden a un HSQC típico y son comunes a muchos de los experimentos presentes en este Capítulo. La sección *a* es el tiempo de relajación, presente en todos los experimentos de RMN y necesario para que la magnetización alcance el estado estacionario antes de empezar la secuencia de pulsos propiamente dicha. La fase *b* consiste en un *inept*  $^1\text{H-}^{15}\text{N}$ , experimento base en la mayoría de las secuencias de pulsos heteronucleares. La parte *d* corresponde a la evolución del heteronúcleo ( $^{15}\text{N}$ ). El pulso de  $180^\circ$  a mitad de la evolución reenfoca el acoplamiento  $^1\text{H-}^{15}\text{N}$ , es decir, equivale a desacoplar estos dos núcleos durante la evolución. Durante la sección *e* la magnetización vuelve del  $^{15}\text{N}$  al  $^1\text{H}$ . Se aprovecha el último pulso de  $180^\circ$  para incorporar una secuencia *watergate*<sup>495</sup> con la que se elimina la señal de agua. Finalmente, la señal del protón se adquiere mientras se desacopla el núcleo  $^{15}\text{N}$  (fase *f*). Los gradientes *G1* y *G2* sirven para eliminar magnetización del plano *xy*, el

gradiente  $G3$  corresponde al propio del *watergate*, mientras que el gradiente  $G4$  (antes y después de los dos pulsos de 180 durante el tiempo  $\Delta$ ) reenfoca exclusivamente la magnetización correspondiente a los pares H-N.



**Figura 27.** Secuencia de pulsos  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -modulated HSQC. Hemos dividido la secuencia en cinco partes: *a*, tiempo de relajación previo a la secuencia; *b*, *inept*  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ; *c*, tiempo de modulación de  $^1\text{H}$ ; *d*, evolución del núcleo de  $^{15}\text{N}$ ; *e*, *inept* re-enfocado; *f*, adquisición.

El tiempo  $\Delta$  (sección *c*) es el parámetro determinante en esta secuencia. Los pulsos de  $180^\circ$  para el  $^1\text{H}$  y el  $^{15}\text{N}$  entre los dos tiempos  $\Delta$  intercambian los estados de espín  $|\alpha\rangle$  por  $|\beta\rangle$ , es decir, sirve para la eliminación de la correlación cruzada (apartado 3.4. de Fundamentos Teóricos). Esta secuencia permite determinar la constante de acoplamiento,  $^1J_{\text{HN}}$ , de forma muy exacta y, a partir de aquí, los acoplamientos dipolares residuales. Para su medida se recogían una serie de espectros variando el valor de  $\Delta$ . De la representación de la intensidad del pico en función de  $\Delta$  (ver más adelante) se obtenía una función sinusoidal cuyo ajuste permitía determinar el valor de  $^1J_{\text{HN}}$  para cada uno de los  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  del esqueleto de la proteína.

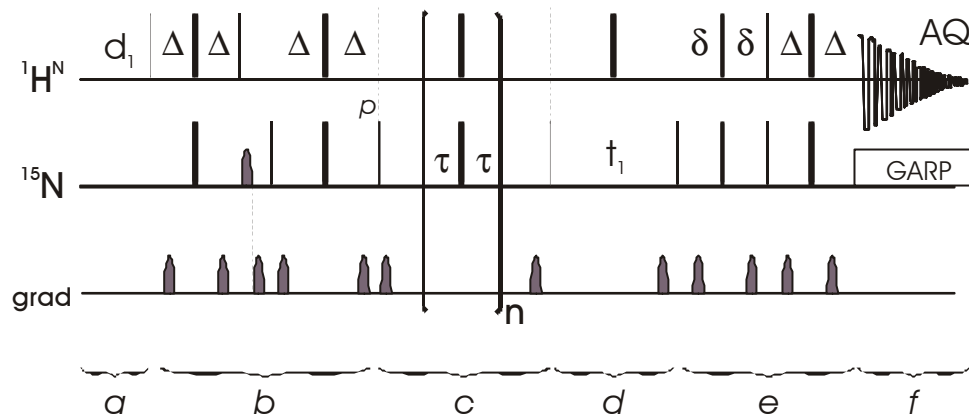
Hemos determinado estas constantes de acoplamiento a dos campos magnéticos distintos 11.7 T (500 MHz para el protón) y 18.8 T (800 Mz). Se realizaron dos series de 15 experimentos para cada uno de los campos con tiempos de desfase  $2\Delta$  de 44.0, 46.2, 47.4, 48.0, 48.6, 49.8, 51.6, 53.4, 55.2, 57.0, 58.2, 58.8, 59.4, 60.6, y 62.4 ms. Los demás parámetros de adquisición y de transformada eran los ya descritos para un experimento HSQC (apartado 2.2). Los experimentos se repitieron dos veces para tener una estimación del error aleatorio. Las intensidades de resonancia se integraban utilizando el paquete software estándar de Bruker. Definíamos las regiones de integración mediante cajas rectangulares. El tratamiento de estos datos se explica en el apartado 3.3.

Hemos realizado estos experimentos con CaCaCb y CaCeCb para la determinación de la estructura y los estudios de desplegamiento de la calbindina (Capítulo 5 y 6 de Resultados).

## 2.5. Experimentos para la Determinación de la Movilidad de la Proteína

### a) Determinación de la velocidad de relajación longitudinal de $^{15}\text{N}$

En la Figura 28 se muestra la secuencia de pulsos que hemos utilizado para realizar estas medidas<sup>502</sup>.



**Figura 28.** Experimento bidimensional utilizado para la determinación de la velocidad de relajación longitudinal de  $^{15}\text{N}$ .

Hemos dividido la secuencia, para su mejor comprensión, en seis secciones. Las secciones *a*, *b*, *d*, *e* y *f* corresponden, respectivamente, al tiempo de relajación, a la secuencia *inept* de transferencia de magnetización protón-nitrógeno, a la evolución del heteronúcleo, a la transferencia inversa de magnetización nitrógeno-protón y a la adquisición directa de la señal del protón. Estas secciones ya han sido explicadas en el apartado anterior y, todas ellas, en conjunto, conducen a la adquisición de un HSQC en el cual la intensidad de la señal adquirida está etiquetada por lo sucedido durante la fase *c* del experimento. Al final de la fase *b* la magnetización del nitrógeno se encuentra en el plano *xy*. La sección *c* comienza con un pulso de  $90^\circ$  sobre el núcleo de  $^{15}\text{N}$  (pulso *p* en la Figura) que lleva su magnetización al eje *z*. A continuación existe un tiempo ( $2\tau$ , donde  $\tau$  era típicamente 2.5 ms), durante el cual el núcleo del nitrógeno se relaja de acuerdo con su tiempo de relajación longitudinal,  $T_1$ . El pulso de  $180^\circ$  intercalado entre este tiempo  $2\tau$  (sección *c*, Figura 28) sirve para eliminar la correlación cruzada entre el acoplamiento dipolar  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  y la *CSA*. Si este bucle se repite continuamente, la diferencia de relajación de las dos coherencias que se miden durante este tiempo se están invirtiendo y, por lo tanto, se compensa la diferente relajación de los dos dobletes. Si se repite un conjunto de experimentos variando el valor de *n* en el bucle de la sección *c*, estamos variando en cada experimento el tiempo en que la magnetización del nitrógeno se mantiene en el eje *z*. Es decir, obtenemos un conjunto de experimentos en los cuales la intensidad del pico

varía desde un valor máximo,  $I_0$ , hasta un valor (para  $n$  muy grande con respecto al  $T_1$  del  $^{15}\text{N}$ ) que será negativo y de valor  $I_{\square} = I_0 \times \gamma_{\text{N}}/\gamma_{\text{H}}$ . De la intensidad de la señal en función del tiempo  $2\tau n$  se obtiene una exponencial de cuyo ajuste a tres parámetros obtenemos el  $T_1$  de los núcleos  $^{15}\text{N}$  (apartado 4.1).

Se realizaron ocho experimentos con los siguientes valores de tiempos de relajación ( $2\tau n$  en la Figura 28): 10, 60, 130, 150, 250, 290, 500 y 800 ms. Es importante en esta secuencia dejar un valor de  $d_1$  (sección *a*, Figura 28) suficientemente grande para que toda la magnetización del  $^{15}\text{N}$  en el eje  $z$  se relaje completamente antes de empezar la secuencia de pulsos. De no ser así, las medidas de relajación serían erróneas. Nosotros dejábamos un  $d_1$  de 3 s. Los demás parámetros y tratamiento de datos fueron análogos a los ya explicados anteriormente.

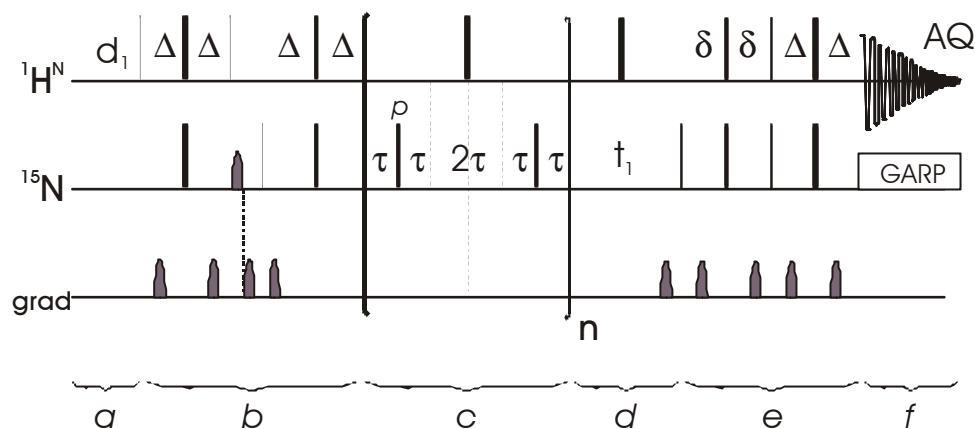
Esta secuencia la hemos utilizado en los estudios de movilidad de la rusticianina (Capítulo 4 de Resultados).

### *b) Determinación de la velocidad de relajación transversal de $^{15}\text{N}$*

En la Figura 29 se muestra la secuencia de pulsos utilizada para la determinación del tiempo de relajación transversal de  $^{15}\text{N}$ <sup>502,503</sup>. Las secciones *a*, *b*, *d*, *e* y *f* de este experimento son equivalentes a las mismas de los anteriores experimentos. Comentaremos sólo la sección *c*. Al final de la sección *b* la magnetización del nitrógeno se encuentra en el plano  $xy$ . Durante el bucle de la sección *c* la magnetización de este heteronúcleo se encuentra siempre en este plano. El bucle está formado a su vez por dos sub-bucles, dispuestos simétricamente y separados por un pulso de  $180^\circ$  sobre el protón (pulso *p*, sección *c*, Figura 29). Este pulso de  $180^\circ$  sirve para reenfoque el acoplamiento  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  que tiene lugar durante la relajación transversal del núcleo de  $^{15}\text{N}$ . Los dos subbucles, que se repiten dos veces cada uno, constan de un tiempo  $\tau$ , un pulso de  $180^\circ$  sobre el  $^{15}\text{N}$  y el mismo tiempo  $\tau$  (secuencia eco CPMG, ver más adelante). Este pulso de  $180^\circ$  elimina el acoplamiento escalar  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  (intercambia los dos dobletes durante la caída de la señal) y la relajación cruzada, de forma que se mide exclusivamente la caída de la magnetización del nitrógeno-15. El tiempo  $\tau$  debe ser muy corto (en nuestro caso lo ajustábamos a  $450 \mu\text{s}$ ) para que la  $^1J_{\text{HN}}$  evolucione lo mínimo posible durante este tiempo. El pulso de  $180^\circ$  sobre el protón a mitad de estos dos bucles tiene como finalidad (al igual que en el experimento de la medida de  $T_1$ ) eliminar la correlación cruzada entre el acoplamiento dipolar  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  y la *CSA* del núcleo  $^{15}\text{N}$ . En definitiva, en cada secuencia de pulsos la magnetización del nitrógeno se mantiene en el plano  $xy$  durante un tiempo  $2\tau \times (3n+1)$ , donde  $n$  es el número de veces que se repite el bucle.

Realizamos ocho experimentos en los que estos tiempos eran de 6.9, 13.8, 27.6, 48.3, 75.9, 110.4, 151.8 y 207 ms. El tiempo de reciclo utilizado era 1.8 s, suficientes para que todo los núcleos de  $^{15}\text{N}$  se hubieran relajado en el plano  $xy$  (Capítulo 3 de Fundamentos Teóricos).

El cálculo de la  $R_2$  de  $^{15}\text{N}$  se realizó en los estudios de movilidad de la rusticianina (Capítulo 4 de Resultados).



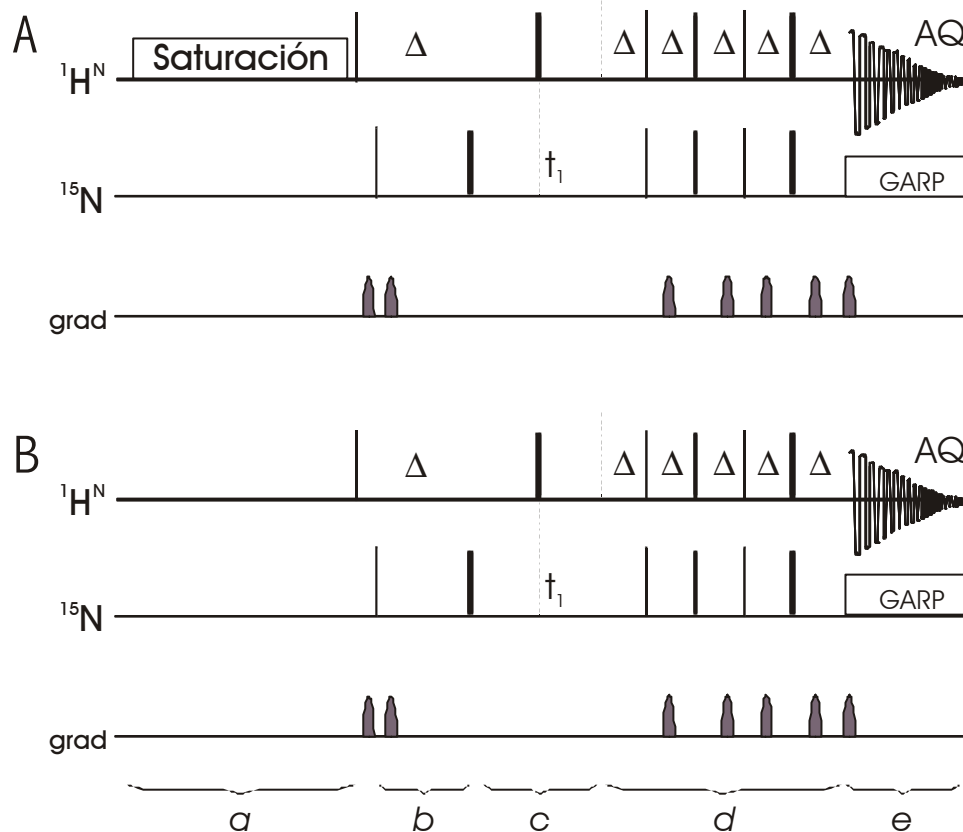
**Figura 29.** Experimento bidimensional utilizado para la determinación de la velocidad de relajación transversal de  $^{15}\text{N}$ .

### c) Determinación del NOE $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$

La Figura 30 muestra la secuencia de pulsos que hemos utilizado para realizar los espectros para la medida de los NOEs  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ . Se trata de dos secuencias de pulsos diferentes aunque muy similares<sup>504</sup>: una, el NOE propiamente dicho (Figura 30-A); y otra, el experimento de referencia (Figura 30-B). Hemos dividido ambas secuencias en cinco partes. La sección *a* es diferente en la secuencia NOE y en la de referencia. En la secuencia NOE se comienza saturando el protón con un tren de pulsos  $\text{P90}-\tau$  (en donde este tiempo  $\tau$  tenía una duración de 5 ms) que se repite hasta completar 2 segundos. En la secuencia de referencia no existe este tren de pulsos y en su lugar, simplemente hay un tiempo con una duración equivalente. En consecuencia, al final de las dos secuencias se obtendrá, por un lado (secuencia NOE, Figura 30-A), un HSQC en el que la intensidad de la señal observada será dependiente de la saturación que se ha aplicado y, por otro (secuencia de referencia, Figura 30-B), un HSQC equivalente sin haber perturbado los protones amida. El cociente entre las intensidades obtenidas mediante ambas secuencias nos dará el efecto NOE.

En la sección *b* de estas dos secuencias se comienza, a diferencia del resto de las secuencias, con un pulso de  $90^\circ$  sobre el núcleo de  $^{15}\text{N}$ . Durante esta parte y la parte *c* se aprovecha la evolución del  $^{15}\text{N}$  para, a la vez, adquirir indirectamente el  $^{15}\text{N}$  y permitir el acoplamiento  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ . Las secciones *d* y *e* de las dos secuencias de la Figura 30 corresponden a las secciones *e* y *f* de los experimentos de los dos apartados anteriores ( $R_1$  y  $R_2$ ), es decir, transferencia de magnetización  $^{15}\text{N}$  a  $^1\text{H}$  y adquisición, respectivamente.

En la práctica realizábamos tres experimentos NOE (presaturando durante 2.5 s) y uno de referencia (con un tiempo de relajación durante el mismo período). En este último la intensa señal del agua se eliminaba parcialmente mediante un mecanismo de *flip-back*<sup>505</sup>. De la media de los valores obtenidos en los tres experimentos NOE obteníamos el error de la medida.



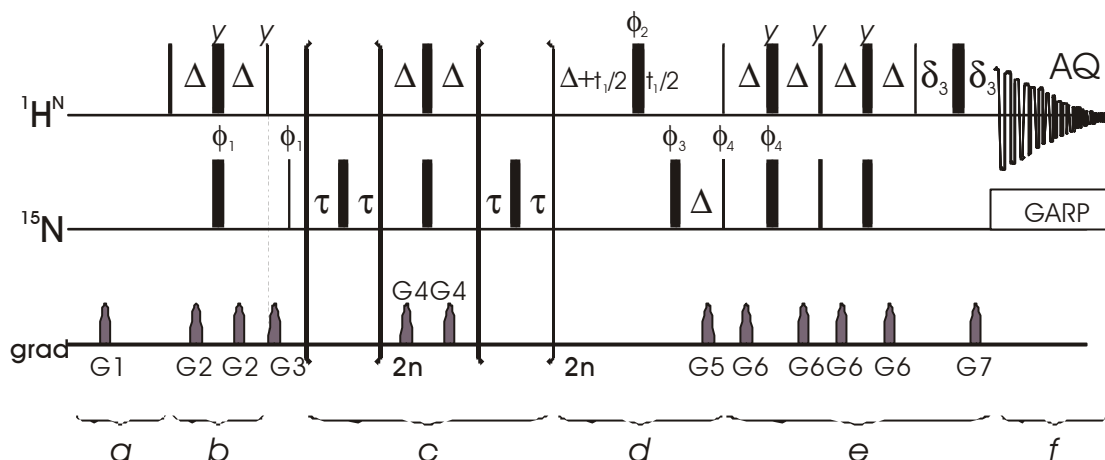
**Figura 30.** Experimento bidimensional utilizado para la determinación del NOE de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ .

Como las secuencias anteriores, ésta se utilizó también en el Capítulo de movilidad de rusticianina (Capítulo 4 de Resultados).

*d) Determinación de la  $R_2(1/t_{cp})$  de  $^{15}\text{N}$*

En la Figura 31 se muestra una de las secuencias de pulsos empleadas en la determinación del tiempo de relajación transversal en función del tiempo  $\tau_{cp}$  según la secuencia de pulsos de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)<sup>486</sup>. Como se indica en el Capítulo 4 de Fundamentos Teóricos, esta

secuencia permite determinar el grado de movilidad de residuos en la escala de tiempo de milisegundos.



**Figura 31.** Secuencia de pulsos para la determinación de  $R_2(1/\tau_{cp})$  de los núcleos  $^{15}\text{N}$ .

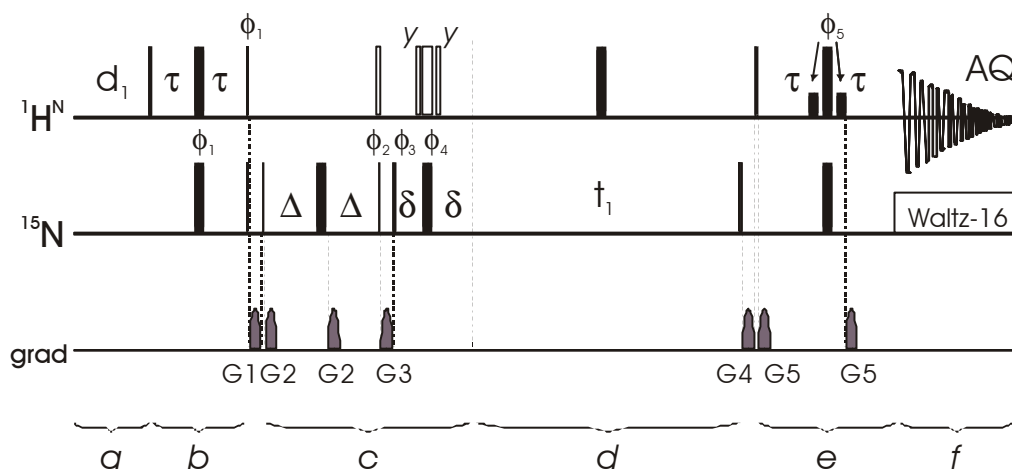
Como en los casos anteriores hemos dividido la secuencia en seis secciones (*a-f*). Las secciones *a*, *b*, *d*, *e* y *f* son iguales a las secciones análogas en los experimentos de  $R_1$  y  $R_2$ . Durante el período *c* se produce el fenómeno que queremos observar. La fase *c* de esta secuencia es muy similar a la ya comentada para la determinación del  $R_2$  y los bucles existentes son prácticamente iguales. Esta sección consta de dos ecos CPMG,  $\tau$ -P180( $^{15}\text{N}$ )- $\tau$ , simétricamente distribuidos. Durante estos bucles (tiempo  $4\tau + 2\Delta$ ) la magnetización del núcleo de  $^{15}\text{N}$  permanece en el plano  $xy$ . El pulso de  $180^\circ$  sobre el nitrógeno en medio de los dos intervalos  $\tau$  tiene la misma finalidad que en el experimento para la determinación del  $R_2$ : eliminar el acoplamiento escalar  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  (intercambia los dos dobletes durante la caída de la señal) y la relajación cruzada. El pulso de  $180^\circ$  sobre el protón a mitad de estos dos bucles tiene como finalidad, como en los casos anteriores, eliminar la correlación cruzada entre el acoplamiento dipolar  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  y la *csa* del núcleo  $^{15}\text{N}$ .

El tiempo  $\tau_{cp}$  (tiempo del eco en la secuencia CPMG) es, en esta secuencia,  $2\tau$ . Realizando un conjunto de experimentos para un  $\tau_{cp}$  constante, es decir, haciendo variar el valor de  $n$  en cada experimento, podemos determinar cómo varía la intensidad de la señal en función de su  $R_2$  para ese valor de  $\tau_{cp}$ . Con esta secuencia determinamos el valor de  $R_2(1/\tau_{cp})$  para los valores de  $\tau_{cp}$  desde 1.0 hasta 6.6 ms. Se han descrito dos secuencias similares para la determinación de  $R_2(1/\tau_{cp})$  a 10.8, 21.5 y 64.5 ms<sup>486</sup>. El fundamento teórico es el mismo que el aquí expuesto. Una vez obtenidos un conjunto de datos de  $R_2$  para valores de  $\tau_{cp}$  desde 1 a 64.5 ms, éstos fueron analizados como se detalla en el apartado 4.2.

Esta secuencia se ha utilizado en el estudio de la desnaturalización de la calbindina D<sub>9k</sub> (Capítulo 6 de Resultados).

## 2.6. Determinación de las Velocidades de Correlación Cruzada

La correlación cruzada entre la relajación dipolar de <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H y la CSA del <sup>15</sup>N da lugar a diferentes velocidades de relajación de los dobletes de estos pares de núcleos <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H (velocidad de correlación cruzada, *CCR*). En la Figura 32 se muestra un esquema de las secuencias de pulsos utilizadas para cuantificar este efecto<sup>490</sup>. La diferencia en intensidad de los picos cruzados <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H de cada una de las secuencias nos ha proporcionado información de la magnitud de la CSA (ver apartado 3.4. de Fundamentos Teóricos).



**Figura 32.** Secuencia de pulsos para la determinación cuantitativa de la correlación cruzada.

Esta secuencia de pulsos es esencialmente un experimento de correlación <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H HSQC, con un período de relajación  $2\Delta$  insertado antes del período de evolución de <sup>15</sup>N (sección c). El experimento se lleva a cabo dos veces, una aplicando los pulsos, señalados en blanco en la figura, de  $90^\circ$  compuestos y  $180^\circ$  sobre <sup>1</sup>H, y otra sin aplicar estos pulsos. Así, en el experimento obtenido a partir de la primera secuencia todas las señales obtenidas son el resultado de efectos de *CCR*<sup>490</sup> en el período  $2\Delta$ . Para las medidas de la correlación cruzada se deben llevar a cabo dos conjuntos de medidas: el primero para detectar la contribución de la componente en fase de la correlación cruzada a la relajación transversal (aplicando los pulsos señalados en blanco) y el segundo para detectar la componente en antifase (sin aplicar los pulsos marcados).



Realizamos dos series de cuatro experimentos con los siguientes tiempos de desfase: 23.4, 34, 48 y 66 ms. Las ventanas espectrales utilizadas eran de 21 y 40 ppm para  $^1\text{H}$  y  $^{15}\text{N}$  respectivamente, en el caso de la rusticianina (Capítulo 4 de Resultados) y 16 y 30 ppm en el caso de la calbindina  $\text{D}_{9\text{k}}$  (Capítulo 6 de Resultados).

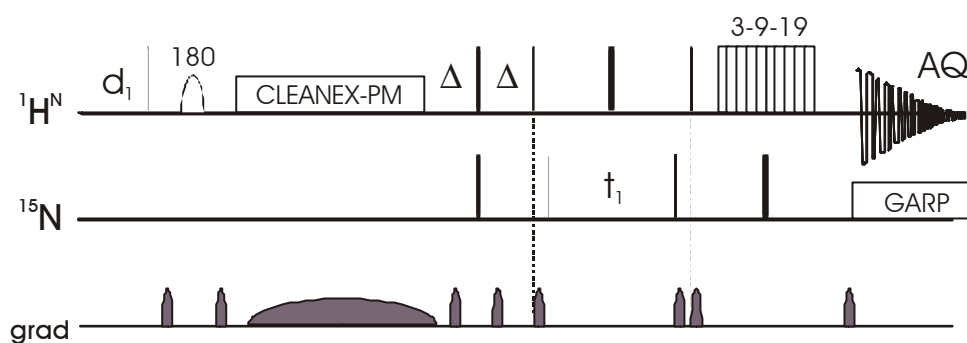
Utilizamos esta secuencia durante el estudio de la movilidad de la rusticianina (Capítulo 4 de Resultados) y se determinaron los valores de *CCR* para diferentes concentraciones de proteína y en sus dos estados de oxidación. La utilizamos también en los estudios de desnaturalización de la calbindina  $\text{D}_{\text{k}}$  (Capítulo 6 de Resultados) para determinar los valores de *CCR* de los dos metaloderivados de la proteína, CaCaCb y CaCeCb, en presencia de agente desnaturalizante.

## **2.7. Determinación de Moléculas de Agua en la Superficie de la Proteína**

### *a) Protones en intercambio rápido*

La secuencia (CLEANEX-PM)-FHSQC<sup>506</sup> (*Phase-Modulated CLEAN chemical EXchange spectroscopy with Fast-HSQC*, simplemente *cleanex* de aquí en adelante) permite determinar los protones que están en intercambio químico con el disolvente y los NOEs intermoleculares que se establecen entre las macromoléculas y el agua de hidratación. Estas interacciones se habían determinado anteriormente mediante experimentos NOESY<sup>507</sup> o ROESY<sup>508,509</sup>, pero éstos daban lugar a error ya que están afectados por artefactos, como la confusión NOE/ROE entre protones de intercambio rápido (grupos hidroxilo o amina), señales NOE/ROE intramoleculares con protones- $\alpha$  con el mismo desplazamiento químico del agua o interacciones de tipo TOCSY. La ventaja que esta secuencia presenta, con respecto a las utilizadas anteriormente, es que elimina todos los NOEs/ROEs debidos a intercambios intramoleculares, la oscilación de la radiación y los efectos TOCSY en el intervalo de frecuencias de trabajo, facilitando así la detección de las auténticas interacciones proteína-molécula de agua. En la Figura 33 se muestra la secuencia de pulsos (CLEANEX-PM)-FHSQC<sup>506</sup>.

Después de la excitación selectiva del agua, se aplica el módulo CLEANEX-PM de *spin lock* durante el período de mezcla mientras tiene lugar el intercambio químico entre los protones del agua y los HN. Durante este período la magnetización se mantiene en el plano *xy*. Los pulsos aplicados durante el módulo CLEANEX-PM cancelan los efectos ROE y NOE llevando continuamente las magnetizaciones a ángulos diferentes. Al final del período de mezcla se utiliza la secuencia FHSQC<sup>510</sup> como esquema de detección para resolver los picos y devolver la magnetización del agua al eje *Z* antes de la detección. De esta forma se evita la saturación del agua<sup>504</sup>.



**Figura 33.** Secuencia de pulsos *cleanex*.

Las ventanas espectrales eran de 21 x 40 ppm para  $^1\text{H}$  y  $^{15}\text{N}$  respectivamente, en el caso de la rusticianina y 16 x 30 ppm para la calbindina  $\text{D}_{9\text{k}}$ . El tiempo de mezcla era de 100 ms.

Medimos las velocidades de intercambio rápido de los protones amida de  $\text{Cu(I)Rc}$  para el estudio de la movilidad de esta proteína (Capítulo 4 de Resultados). También medimos las de  $\text{Ca}_2\text{Cb}$  en presencia de agente desnaturalizante para el estudio de la desnaturalización de la calbindina  $\text{D}_{9\text{k}}$  (Capítulo 6 de Resultados).

### b) Moléculas de agua estructurales

La secuencia de pulsos ePHOGSY<sup>511</sup> (*enhanced Protein Hydration Observed through Gradient Spectroscopy*) permite detectar la interacción dipolar que existe entre un protón y una molécula de agua o entre ese protón y otro en intercambio con el disolvente. Esta secuencia actúa, por lo tanto, como un filtro para las interacciones dipolares agua–proteína. En la presente Tesis (Capítulo 4 de Resultados) hemos empleado este tipo de interacción en un experimento cuya apariencia es la de un HSQC, puesto que aparecen picos de correlación  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ . En este experimento se observan dos tipos de picos: protones de moléculas de agua que dan NOEs reales con protones amida y picos debidos a transferencia de saturación entre moléculas de agua y los protones amida. Estos últimos se observan también en el experimento *cleanex* y se pueden eliminar mediante la comparación entre ambos tipos de experimentos. El primer grupo de picos indica la posición de moléculas de agua que permanecen retenidas en la proteína por un tiempo superior al de correlación de la molécula. Realizamos dos experimentos con tiempos de mezcla distintos: 30 y 100 ms.

Esta secuencia la hemos utilizado en el estudio de movilidad de la rusticianina (Capítulo 4 de Resultados).

## 2.8. Secuencias, Campos y Espectrómetros Utilizados

En la siguiente Tabla se resumen todas las secuencias utilizadas en cada uno de los Capítulos de la sección de Resultados de esta Tesis.

**Tabla 6.** Secuencias utilizadas para cada Capítulo de la presente Tesis. Las columnas, que representan cada Capítulo, son: Co(II)Rc "Estudio de la Rusticianina de Cobalto(II) mediante RMN de  $^1\text{H}$ ", (C. IV.1) Capítulo 1 de Resultados; Cu(II)Rc "Estudio de la Rusticianina de Cobre(II) a 800 MHz", (C. IV.2) Capítulo 2 de Resultados; Rc Mut. "Mutantes de la Metionina Axial en Rusticianina", (C. IV.3) Capítulo 3 de Resultados; Rc Mov. "Dinámica e Hidratación de la Rusticianina", (C. IV.4) Capítulo 4 de Resultados; Cb Estr. "Estructura de CaLnCb: Relevancia de las Restricciones Paramagnéticas", (C. IV.5) Capítulo 5 de Resultados; Cb Desp. "Estudios de Desplegamiento Incipiente de la Calbindina  $D_{9k}$ ", (C. IV.6) Capítulo 6 de Resultados.

	<i>Co(II)Rc</i>	<i>Cu(II)Rc</i>	<i>Rc Mut.</i>	<i>Rc Mov.</i>	<i>Cb Estr.</i>	<i>Cb Desp.</i>
	<b>C. IV.1</b>	<b>C. IV.2</b>	<b>C. IV.3</b>	<b>C. IV.4</b>	<b>C. IV.5</b>	<b>C. IV.6</b>
<i>superweft</i>	×	×	×		×	×
<i>inversion-recovery</i>	×					
NOE	×		×		×	
Transferencia de saturación		×	×			
NOE ciego		×	×			
NOESY					×	×
WEFT-NOESY	×		×			
TOCSY					×	
WEFT-TOCSY	×		×			
HSQC				×	×	×
HSQC-TOCSY				×	×	
HNCA				×	×	
HNCO					×	
HNCO puentes de hidrógeno					×	

**Tabla 6 (continuación)**. Secuencias utilizadas para cada Capítulo de la presente Tesis.

	<i>Co(II)Rc</i>	<i>Cu(II)Rc</i>	<i>Rc Mut.</i>	<i>Rc Mov.</i>	<i>Cb Estr.</i>	<i>Cb Desp.</i>
	<b>C. IV.1</b>	<b>C. IV.2</b>	<b>C. IV.3</b>	<b>C. IV.4</b>	<b>C. IV.5</b>	<b>C. IV.6</b>
<sup>13</sup> C- <sup>13</sup> C COSY					×	
HCCH-TOCSY					×	
NOESY-HSQC					×	
<i>inversion-recovery</i> HSQC					×	
HNHA					×	
HNHB					×	
<sup>1</sup> J <sub>N-H</sub> -modulated HSQC					×	
<i>R</i> <sub>1</sub> ( <sup>15</sup> N)				×		
<i>R</i> <sub>2</sub> ( <sup>15</sup> N)				×		
NOE <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N				×		
<i>R</i> <sub>2</sub> CPMG						×
<i>ccr</i>				×		×
<i>cleanex</i>				×		×
ePHOGSY				×		

La temperatura de trabajo era 23 °C con la rusticianina y 27 °C con la calbindina D<sub>9k</sub>. Los campos magnéticos utilizados se indican en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Campos e instrumentos utilizados en cada Capítulo (los mismos que en la Tabla 6).

Campo (T)	$\nu$ $^1\text{H}$ (MHz)	Instrumento	<i>Co(II)Rc</i> <b>C. IV.1</b>	<i>Cu(II)Rc</i> <b>C. IV.2</b>	<i>Rc Mut.</i> <b>C. IV.3</b>	<i>Rc Mov.</i> <b>C. IV.4</b>	<i>Cb Estr.</i> <b>C. IV.5</b>	<i>Cb Desp.</i> <b>C. IV.6</b>
9.4	400.13	Varian Unity 400	×					
		Bruker Avance 400						×
11.7	500.13	Bruker Avance 500	×		×	×		×
14.1	600.13	Bruker Avance 600				×	×	
16.4	700.13	Bruker Avance 700					×	×
18.8	800.13	Bruker Avance 800		×	×		×	

## 3. Determinación Estructural

En este Capítulo describiremos tanto las clases de restricciones estructurales existentes, fundamentalmente las de origen paramagnético, como la metodología empleada en esta Tesis para el cálculo de estructuras. Ciertas restricciones paramagnéticas dan información esencial sobre la estructura electrónica del metal, independientemente de que se apliquen o no, como restricciones en el cálculo de estructuras. Así, por ejemplo, en rusticianina hemos determinado el tensor de anisotropía magnética del metal (Capítulo 1 de Resultados), aunque no hemos calculado la estructura tridimensional de la proteína. De hecho, de las dos proteínas con las que hemos trabajado, sólo hemos determinado la estructura en disolución de la calbindina D<sub>9k</sub> (tanto de la proteína nativa, Capítulo 5 de Resultados, como de la proteína en estado desplegado incipiente, Capítulo 6). En esta proteína no sólo hemos calculado el tensor de anisotropía magnética, sino que hemos empleado también los desplazamientos de pseudocontacto derivados de él como restricciones. En consecuencia, los parámetros y datos descritos referentes al cálculo de estructuras que se citan en el presente Capítulo se aplicaron exclusivamente a la calbindina (Capítulos 5 y 6 de Resultados).

### 3.1. Susceptibilidad Magnética del Ion Metálico

La determinación del tensor de susceptibilidad magnética para el cobalto(II) en Co(II)Rc (Capítulo 1 de Resultados) se llevó a cabo utilizando el programa FANTASIA<sup>228</sup> (*Finding ANisotropy Tensors: A Simplex Approach*) basado en el algoritmo de minimización *Simplex*. Este programa fue amablemente proporcionado por el profesor Ivano Bertini.

La contribución diamagnética del desplazamiento químico (ecuación 4) se obtuvo de la asignación publicada previamente para Cu(I)Rc<sup>512</sup>. Esta asignación se realizó a pH 3.4, mientras que las muestras de Co(II)Rc se encontraban a pH 6.0. Las coordenadas de la rusticianina se obtuvieron de los ficheros del 1A3Z.pdb con una resolución de 1.90 Å<sup>369</sup>. El sistema de referencia para los ejes cartesianos se definió de la siguiente manera: el ion cobalto se tomaba como centro, el eje *x* se definía sobre el enlace Cu-S $\gamma$ Cys138 (Figura 8), el plano *xy* era el formado por el ion metálico, el átomo S $\gamma$  de Cys138 y el N $\delta$ 1 de His85; finalmente el eje *z* era el resultado del producto vectorial de

los dos vectores que conectaban estos dos últimos átomos con el ion metálico, definiéndose el signo positivo de este vector en la dirección donde se encuentra el átomo Sδ de Met121.

Para los trabajos de la calbindina (Capítulos 5 y 6 de Resultados) las componentes de anisotropía magnética, así como la orientación del tensor, se recalculaban (mediante el programa FANTASIAN) a medida que aumentaba el refinamiento de las estructuras, hasta que se llegaba a la convergencia. En los cálculos omitíamos los valores de  $\rho_{CS}$  de los ligandos del metal. El valor final descrito es un promedio de los parámetros del tensor  $\mathbf{C}$  para toda la familia.

El desplazamiento de pseudocontacto de los núcleos se obtenía tras sustraer, al desplazamiento experimental de los derivados de CaLnCb (donde Ln = Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, todos ellos en estado de oxidación III), el observado para el núcleo correspondiente en el derivado CaLaCb de la proteína nativa, salvo para los núcleos de  $^{13}\text{C}$  y los protones de las cadenas laterales en que se utilizaba Ca<sub>2</sub>Cb como análogo diamagnético (ecuaciones 4 y 5). En los estudios de desnaturalización (Capítulo 6 de Resultados) la contribución diamagnética se obtenía para todos los núcleos a partir del desplazamiento químico de los núcleos en Ca<sub>2</sub>Cb.

### **3.2. Susceptibilidad Magnética Molecular**

Los parámetros para calcular el tensor de susceptibilidad molecular,  $\mathbf{C}^{\text{mol}}$  (Capítulo 2 de Fundamentos Teóricos), se obtenían del ajuste de los valores de  $\Delta rdc$  a la ecuación 26. Se realizaba un cálculo iterativo partiendo de un modelo estructural. En este caso tomamos como punto de partida una familia de 30 confórmeros superpuestos cuyas coordenadas habían sido previamente calculadas sin las restricciones  $\Delta rdc$ . Ajustábamos los parámetros  $\Delta \mathbf{C}_{ax}^{\text{mol}}$ ,  $\Delta \mathbf{C}_{rh}^{\text{mol}}$  y las tres coordenadas polares independientes ( $r$ ,  $\mathbf{q}$  y  $\mathbf{f}$ ) necesarias para definir la dirección del tensor respecto a un sistema de ejes externo. El valor minimizado es la suma del cuadrado de las diferencias entre los valores de  $\Delta rdc$  calculados y experimentales. Para el cálculo del tensor hemos utilizado el programa FANTAORIENT<sup>219</sup>. Para todos los valores de  $\Delta rdc$ , utilizábamos una tolerancia de 10 Hz.

De forma análoga a como hacíamos para el tensor de anisotropía magnética del metal, los valores obtenidos para  $\Delta \mathbf{C}_{ax}^{\text{mol}}$  y  $\Delta \mathbf{C}_{rh}^{\text{mol}}$  junto con los de  $\Delta rdc$  los utilizábamos como restricciones para el cálculo de estructuras. Utilizábamos la familia resultante de los 30 mejores confórmeros como la nueva estructura inicial para la determinación de los parámetros del tensor. Repetíamos el procedimiento entero hasta que conseguíamos la convergencia entre la familia de estructuras y los parámetros del tensor.

### 3.3. Restricciones Obtenidas por RMN

#### a) *Restricciones dipolares*

##### a.1) *NOE*

Las restricciones NOE se obtienen, normalmente, por integración de los picos en los experimentos NOESY. Las 2164 restricciones NOESY que hemos utilizado en la determinación de la estructura de la calbindina (Capítulo 5 de Resultados) se habían obtenido previamente en el cálculo de la estructura que nos sirvió de punto de partida<sup>248</sup>. Los espectros NOESY utilizados se habían obtenido con un tiempo de mezcla de 60 ms. Las intensidades de los picos cruzados se integraron utilizando las regiones elípticas del programa XEASY<sup>513</sup>. Posteriormente estas intensidades se convertían en distancias interatómicas superiores mediante el programa CALIBA<sup>433</sup>. Las distancias NOE se recalibraban después de cada ciclo de cálculo del programa PSEUDYANA<sup>144</sup> (Capítulo 1 de Fundamentos Teóricos). En este punto, se podían asignar nuevos picos-cruzados NOESY mediante su cálculo utilizando el programa CORMA<sup>514</sup>. Las asignaciones estereoespecíficas de los protones diastereotópicos y los grupos metilo se obtuvieron utilizando el programa GLOMSA<sup>433</sup>. No hemos realizado ninguna nueva asignación sobre los resultados previamente obtenidos.

Con anterioridad también se habían obtenido 13 restricciones NOE 1D<sup>248</sup> que hemos utilizado en el cálculo de la estructura. En este caso hemos ido recalibrando los valores a medida que se mejoraba la resolución de la estructura mediante el protocolo CALIBA.

##### a.2) *Velocidades de relajación*

Las velocidades de relajación de las señales correspondientes a núcleos que se encuentran cercanos al ion paramagnético se pueden introducir en el cálculo de estructuras<sup>165,166,228,458,515</sup> puesto que dan información de la distancia de estos núcleos al ion metálico (ecuación 16). Medimos las velocidades de relajación longitudinales no selectivas de los protones mediante experimentos *inversion-recovery* HSQC<sup>458</sup> (apartado 2.3) para los núcleos <sup>13</sup>C y <sup>15</sup>N. La intensidad de las señales se representaba en función de los tiempos de recuperación y se ajustaban a una función mono-exponencial de tres parámetros.

$$I(t) = A + B \exp(-tR_1) \quad [34]$$

donde  $A$ ,  $B$  y  $R_1$  son los parámetros a ajustar y  $t$  es el tiempo de recuperación,  $d_2$ , que se varía en la secuencia de pulsos (apartado 2.3).

A las velocidades de relajación experimentales ( $R_1^{\text{exp}}$ ) se les sustraía la contribución diamagnética ( $R_1^{\text{dia}}$ ) (ecuación 11), donde  $R_1^{\text{dia}}$  se estimaba a partir del valor medio de  $R_1^{\text{exp}}$  obtenido para los protones alejados del ion metálico (para los que  $R_1^{\text{para}} = 0$ ). Los valores de  $R_1^{\text{dia}}$



utilizados en este trabajo fueron  $2.0 \text{ s}^{-1}$  para los protones amida, y  $1.2 \text{ s}^{-1}$  para los protones enlazados a núcleos de carbono.

Para convertir los valores obtenidos en “límites superiores e inferiores de distancias” metal-núcleo,  $r$  (*upper o lower distance limits*) según la metodología CALIBA<sup>433</sup>, representábamos los valores de  $R_1^{\text{para}}$  en función de esta distancia que se obtenía a partir de las estructuras en los diferentes pasos de refinamiento. Para obtener estos límites superiores e inferiores de distancias utilizábamos la siguiente expresión derivada de la ecuación de Solomon (ecuación 16):

$$R_1^{\text{para}} = K \cdot r^{-6} \quad [35]$$

El valor de  $K$  depende del núcleo observado (ecuación 16) y se modificaba a medida que el grado de resolución de las estructuras aumentaba. El valor final que utilizamos fue  $2.6 \times 10^{-55} \text{ s}^{-1} \text{ m}^6$ .

Finalmente, hemos utilizado las velocidades de relajación longitudinales de 22 protones obtenidas en los experimentos *inversion-recovery* HSQC (apartado 2.3) y de 4 núcleos de  $^{13}\text{C}$ .

### a.3) Desplazamientos de pseudocontacto

Los iones metálicos se incluyen en el cálculo de estructuras como pseudoátomos con seis vectores unitarios: tres de ellos definen el tensor de anisotropía magnética y otros tres el tensor de orientación molecular.

Los desplazamientos de pseudocontacto experimentales para los núcleos  $^{15}\text{N}$  y los  $^1\text{H}$  del esqueleto de la proteína en los derivados CaLnCb se obtenían a partir de los desplazamientos observados de acuerdo con la ecuación 4. Los desplazamientos diamagnéticos,  $d^{\text{dia}}$ , eran los correspondientes al derivado CaLaCb; salvo para los átomos de  $^{13}\text{C}$  y los protones de las cadenas laterales en los que el análogo diamagnético fue Ca<sub>2</sub>Cb. Los valores de  $d^{\text{pc}}$  calculados se obtuvieron asumiendo la aproximación *metal center*, esto es, aplicando la ecuación 7 al núcleo correspondiente.

Como hemos visto en el apartado 3.1, los desplazamientos de pseudocontacto se utilizan para determinar las componentes axial y rómbica del tensor de anisotropía magnética y su orientación. Además, los  $d^{\text{pc}}$  pueden ser incluidos como restricciones en el cálculo de estructuras en disolución. Las coordenadas del tensor de anisotropía magnética del metal también pueden ser introducidas como restricciones en dicho programa. Así, el resultado final del tensor y de la estructura será producto de un cálculo iterativo: se determina el tensor a partir de una estructura de la proteína tomada como punto de partida, y, a continuación, este mismo tensor se utiliza para refinar la estructura. El proceso se repite hasta que se consigue la convergencia.

#### a.4) Acoplamiento dipolares residuales

Los acoplamiento dipolares residuales que utilizamos en el cálculo de la estructura de CaCeCb se obtuvieron previamente en el Laboratorio de Florencia<sup>219</sup>.

Las constantes de acoplamiento de cada uno de los enlaces  $^{15}\text{N}-^1\text{H}$  se determinaron a partir de las intensidades de los picos de la serie de espectros denominada  $^1\text{J}_{\text{NH}}$ -modulated HSQC. Las intensidades de cada una de las señales a lo largo de la serie se ajustaban a la siguiente ecuación:

$$I(2\Delta) = A \cos(2pJ_{\text{HN}}\Delta) \exp(-(2\Delta / T_2^*)) \quad [36]$$

donde  $2\Delta$  es el tiempo de desfase;  $1/T_2^*$  es la velocidad de decaimiento efectivo de la magnetización de  $^{15}\text{N}$  debido a la relajación transversal y  $A$  es la intensidad del pico para  $2\Delta = 0$ .

Los acoplamiento dipolares residuales se calculan como la diferencia de los obtenidos a dos campos,  $\Delta rdc$ , según lo indicado en el capítulo de Fundamentos Teóricos (ecuación 24). Los  $\Delta rdc$  se introducen en los programas de cálculo de estructuras como restricciones adicionales, para ello se implementó el programa con la función diana correspondiente<sup>221</sup>.

#### b) Restricciones escalares

##### b.1) Constantes de acoplamiento

Calculamos las constantes de acoplamiento  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$  a partir de las relaciones obtenidas entre la intensidad del pico de la diagonal ( $\nu_{1\text{HN}}$ ,  $\nu_{2\text{N}}$ ,  $\nu_{3\text{HN}}$ ) y la del pico de cruce ( $\nu_{1\text{H}\alpha}$ ,  $\nu_{2\text{N}}$ ,  $\nu_{3\text{HN}}$ ) tras integrar de 3 a 5 planos  $^1\text{H}-^1\text{H}$  del experimento HNHA<sup>441</sup>. Las constantes de acoplamiento se convertían en restricciones de los ángulos de torsión  $\boldsymbol{f}$  del esqueleto utilizando las curvas de Karplus adecuadas<sup>46</sup>. Los ángulos obtenidos se introducían en el programa de cálculo con un error de  $\pm 10^\circ$ , salvo en el caso de ocho ángulos en los que el intervalo de error se estableció en  $\pm 20^\circ$ . Cuando para un valor de las constantes de acoplamiento eran posibles varias soluciones de las ecuaciones de Karplus, elegíamos el ángulo diedro consistente con las estructuras calculadas sin esa restricción.

Obtuvimos los ángulos diedros  $\boldsymbol{y}$  a partir de la relación  $J_{\text{HNH}\alpha}/J_{\text{HNH}\alpha-1}$ , obtenida tras la integración del experimento  $^{15}\text{N}$  NOESY-HSQC<sup>449</sup>. El término  $J_{\text{HNH}\alpha}$  corresponde a la intensidad, en el NOESY, del pico de cruce del protón amídico y el protón- $\alpha$  del mismo residuo, mientras que el término  $J_{\text{HNH}\alpha-1}$  corresponde a la intensidad del pico del mismo protón amídico con el protón- $\alpha$  del residuo precedente. Cuando el valor de esta relación era mayor de 2.0, el ángulo  $\boldsymbol{y}$  se fijaba en el intervalo de  $-65^\circ$  a  $+5^\circ$  para todos los aminoácidos excepto para Ile, Thr y Ala. Para estos aminoácidos se estrechaba el intervalo entre  $-65^\circ$  y  $-15^\circ$ . Si la relación era menor que 1.0, se

consideraba que el valor de  $\gamma$  estaba comprendido en el intervalo de  $100^\circ$  a  $170^\circ$  para todos los aminoácidos.

Utilizamos los valores de  $^3J_{\text{HNHB}}$  para realizar la asignación estereoespecífica de los protones metilénicos. Estas constantes de acoplamiento se obtenían a partir de la intensidad relativa de los dos picos de cruce HN-H $\beta$  del experimento tridimensional HNHB<sup>436</sup>.

### b.2) Puentes de hidrógeno

Hemos determinado los puentes de hidrógeno de manera directa utilizando un experimento HNCO bidimensional con un *inept* de  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$  donde el tiempo de transferencia era 66 ms (apartado 2.3). Este tiempo optimiza la transferencia de la coherencia entre un protón amídico y un grupo carbonílico que estén formando un puente de hidrógeno.

Las constantes de acoplamiento  $^3h_{\text{N-CO}}$  observadas se pueden traducir en restricciones del cálculo de estructuras en límites superiores de distancias N $\cdots$ O. Así mismo, para mantener la linealidad del enlace también se introducían límites inferiores a las distancias N $\cdots$ O y H $\cdots$ O. Concretamente, cuando se observaba un puente de hidrógeno en el experimento HNCO específico para su detección<sup>442</sup> (apartado 2.3) se introducían las siguientes restricciones:

$$r_{\text{H}\cdots\text{O}} < 2.2 \text{ \AA} \quad \text{y} \quad 2.6 \text{ \AA} < r_{\text{N}\cdots\text{O}} < 3.3 \text{ \AA}$$

donde  $r_{\text{H}\cdots\text{O}}$  y  $r_{\text{N}\cdots\text{O}}$  son las distancias del oxígeno al protón amida y al nitrógeno, respectivamente, en los puentes de hidrógeno formados. Los límites de distancia inferiores están restringidos a mantener la linealidad del puente de hidrógeno.

## 3.4. Cálculo de Estructuras

El programa utilizado para el cálculo de la estructura del derivado de cerio(III) de la calbindina D<sub>9k</sub> era una versión modificada del programa DYANA<sup>143</sup>, llamado PSEUDYANA<sup>144</sup>, que permite el uso de *pcs* como restricciones. El programa utiliza la dinámica de torsión de ángulos, TAD (*Torsion Angle Dynamics*) y el algoritmo *simulated annealing*. Se calculaba una familia de 200 estructuras partiendo de confórmeros generados al azar en 10000 pasos de *annealing*. La calidad de las estructuras calculadas por PSEUDYANA se estimaba mediante una función definida adecuadamente mediante la función diana que es proporcional al cuadrado de las desviaciones de las restricciones calculadas respecto a las experimentales. En el programa DYANA (y también en PSEUDYANA) la función diana tiene el papel de energía potencial. La función diana tiene dimensiones de longitud al cuadrado (sus valores se expresan en  $\text{\AA}^2$ ). La familia de estructuras elegida estaba formada por los 30 confórmeros con menor función diana.

Los parámetros utilizados para el cálculo de la estructura de CaCeCb parcialmente desnaturalizada (Capítulo 6 de Resultados) fueron los mismos que los descritos anteriormente. El programa utilizado para estos cálculos fue la nueva versión PARAMAGNETIC-DYANA<sup>221</sup>.

Para analizar las estructuras calculadas hemos utilizado los programas RASMOL<sup>516</sup>, MOLMOL<sup>517</sup> y PROCHECK-NMR<sup>518</sup>.

## 4. Dinámica de proteínas

### 4.1. Cálculo de $R_1$ y $R_2$ de $^{15}\text{N}$ y de NOE $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$

Las intensidades de los picos cruzados se extraían de los experimentos bidimensionales (apartado 2.5). Los valores de las velocidades de relajación longitudinal y transversal,  $R_1$  y  $R_2$ , respectivamente, de  $^{15}\text{N}$  se determinaron mediante el ajuste de las intensidades de una señal en la serie de experimentos, a la ecuación:

$$I(t) = I_{\infty} + (I_0 - I_{\infty}) \exp(-tR_{1,2}) \quad [37]$$

donde  $t$  representa el tiempo de recuperación con dos parámetros de ajuste independientes,  $R_{1,2}$ ;  $I_0$  representa la intensidad de la señal para un tiempo  $t = 0$  s. El parámetro  $I_0$  se ajustaba a 0 para las medidas de relajación transversal,  $R_2$ . Las incertidumbres en los valores de  $R_1$  y  $R_2$  se obtienen mediante el protocolo Monte Carlo<sup>480</sup>.

Los valores de los NOEs de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  se determinaban mediante la razón que existe entre la intensidad del pico cruzado en el experimento realizado saturando el  $^1\text{H}$ ,  $I_{sat}$ , y el realizado sin saturar,  $I_{insat}$  (apartado 2.5):

$$NOE = I_{sat} / I_{insat} \quad [38]$$

Se realizaban tres experimentos sin saturar los protones amida. Cada uno de los NOEs se calculaba a partir de la media de los valores obtenidos en los tres experimentos. De esta forma se obtenían valores fiables de cada NOE. Considerábamos los errores tres veces la desviación estándar,  $3\sigma$ , de las diferencias entre los tres valores de NOE obtenidos para cada par HN.

## 4.2. Análisis Model-free

El análisis *model-free* lo utilizamos para el estudio de la movilidad de la rusticianina (Capítulo 4 de Resultados).

Realizábamos el análisis del movimiento rotacional de toda la proteína a partir de las relaciones  $R_2/R_1$  de cada par N-H mediante el programa Quadric Difusión<sup>519</sup>, versión 1.11. En estos cálculos utilizábamos la estructura media (minimizada previamente) de la familia de estructuras de la rusticianina (archivo 1CUR.pdb<sup>370</sup>). Los valores de  $R_2/R_1$  que eran superiores a la media en una cantidad mayor al doble de la desviación estándar, los eliminábamos<sup>520</sup>. Repetíamos este proceso hasta que todos los valores caían dentro del intervalo de la media  $\pm 2s$ . Este mismo criterio era el que seguíamos para discernir qué datos se desviaban o no de la media. Así, hemos podido discriminar los pares N-H con un comportamiento dinámico individual de los que seguían el mismo patrón global de toda la estructura de la proteína. Probamos los parámetros de difusión correspondientes a los modelos isotrópico, axial simétrico y completamente anisotrópico<sup>476,480</sup>. Utilizamos el factor  $F$ <sup>481,482</sup> para comprobar la mejora estadística de ajuste de cada modelo.

Se analizaron los datos de relajación ( $R_1$ ,  $R_2$  y NOE  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ) de acuerdo con el protocolo *model-free* de Lipari y Szabo<sup>478,479</sup> (apartado 3.2), utilizando el programa Modelfree<sup>476</sup>, versión 4.0. La función de densidad espectral,  $J(\mathbf{w})$ , viene dada por la ecuación 31. Si la suma de los errores de los cuadrados (*sum of squared errors*, SSE) era menor de 10 para el Modelo 1, tomábamos éste como correcto para los pares N-H correspondientes. Para valores de SSE mayores, se aplicaban los Modelos 2 y 3 y se asumían como correctos si  $\text{SSE} < 10$ . Sólo se eligió el Modelo 4 para un residuo (Leu46, Capítulo 4 de Resultados).

## 4.3. Dinámica Lenta de Proteínas

El valor de  $R_2$  a un  $\tau_{cp}$  determinado se obtenía mediante el ajuste a dos parámetros ( $I_0$ ,  $R_2$ ) de las intensidades de los picos obtenidos,  $I(t)$ , mediante la secuencia de pulsos CPMG (apartado 2.5) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$I(t) = I_0 \exp(-tR_2) \quad [39]$$

donde  $I_0$  es la intensidad a tiempo cero (intensidad de los picos en el experimento de referencia, secuencia de pulsos de la Figura 31, pero omitiendo los tiempos y pulsos que en esa Figura se encuentran dentro de los paréntesis). El tiempo  $t$  se elegía igual a  $4n \cdot \tau_{cp}$ . Para cada valor de  $\tau_{cp}$  se modificaba  $n$ , tal que el tiempo  $t$  variaba entre el mínimo valor posible ( $4 \cdot \tau_{cp}$ , típicamente 4-20 ms) y 240 ms.

De esta forma obteníamos las curvas de dispersión  $R_2(1/\tau_{cp})$ . Hemos calculado los valores de  $R_2$  para cuatro valores de  $\tau_{cp}$  diferentes: 1.0 ms, 6.6 ms, 21.5 ms, 64.5 ms. Los valores de  $R_2$  obtenidos para cada uno de los residuos se representan en función de la inversa de  $1/\tau_{cp}$ . Cuando no se observaba dependencia de los valores de velocidad de relajación transversal con el período entre pulsos de  $180^\circ$  en la secuencia CPMG, significaba que el aminoácido no está sujeto a procesos de intercambio químico.

Estos cálculos se realizaron para el derivado CaCaCb parcialmente desnaturalizado (Capítulo 6 de Resultados).

#### **4.4. Velocidades de Correlación Cruzada**

Obteníamos las velocidades de correlación cruzada,  $CCR$ , entre la interacción dipolar de los núcleos  $^{15}\text{N}$  y  $^1\text{H}$  y la anisotropía del desplazamiento químico,  $CSA$ , de los núcleos  $^{15}\text{N}$ , mediante la expresión:

$$I_A / I_B = \tanh(2\Delta h) \quad [40]$$

donde  $I_A$ , e  $I_B$  son las intensidades de los picos para cada evolución del tiempo  $\Delta$  en los dos esquemas de experimentos anteriormente explicados (apartado 2.6) y el término  $2h$  representa los valores de  $CCR^{490}$ . Cuando no se producen fenómenos de intercambio, los valores de  $CCR$  son, en buena aproximación, proporcionales al parámetro de orden generalizado<sup>490</sup>,  $S^2$ .

Estos cálculos se realizaron tanto para la rusticianianina oxidada y reducida (Capítulo 4 de Resultados), como para la calbindina D<sub>9k</sub> parcialmente desnaturalizada (Capítulo 6 de Resultados).





## IV. Resultados



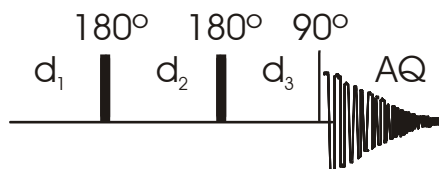
# 1. Estudio de la Rusticianina de Cobalto(II) mediante RMN de $^1\text{H}$

En el presente capítulo hemos estudiado el derivado de cobalto(II) de la rusticianina mediante RMN de  $^1\text{H}$ . Hemos asignado la mayoría de las señales con desplazamiento hiperfino. Hemos determinado la orientación y las componentes axial,  $\Delta\chi_{\text{ax}}$ , y róbica,  $\Delta\chi_{\text{rh}}$ , del tensor de anisotropía de susceptibilidad magnética del ion cobalto(II), con el objetivo de obtener una detallada estructura electrónica y molecular de este derivado metalosustituido de la rusticianina. La comparación de nuestros resultados con los de otros sistemas nos ha permitido, además, evaluar los factores que determinan el potencial redox de Rc.

## 1.1. Secuencia *Invsuperweft*

La secuencia de pulsos *invsuperweft*, que se muestra en la Figura 34, ha sido inventada en nuestro grupo para facilitar la detección y asignación de señales paramagnéticas que se encuentran ocultas en la zona diamagnética de los espectros de RMN de protón. En esta nueva secuencia hay un grado de libertad más que en la secuencia *superweft*<sup>251</sup> ( $AQ, d_1, d_2$  y  $d_3$ ). Esta nueva secuencia tiene tres ventajas adicionales. En primer lugar, la adecuada elección de los tiempos  $d_1, d_2$  y  $d_3$  puede dar lugar a valores para el tiempo de adquisición más largos que los obtenidos mediante la secuencia *superweft*, de modo que se obtiene mayor resolución. Este punto es especialmente relevante para la detección de los protones que se encuentran en la región denominada “pseudo-diamagnética” (entre  $-10$  y  $20$  ppm) y en la diamagnética. En segundo lugar, se consigue una menor dispersión de la línea base, ya que los tiempos de adquisición y de reciclo son más largos. Por último una adecuada elección de los tres tiempos de la secuencia permite filtrar la observación de protones de una forma más selectiva que la secuencia *superweft* (siempre en base a los valores de  $T_1$ ). Esto último incluye también los protones del agua que se eliminan más eficazmente con esta nueva secuencia que con el *superweft* original. Por el contrario, presenta como inconveniente que los tiempos de reciclo son más largos que cuando se adquiere con la secuencia *superweft* en condiciones muy rápidas. Por lo tanto,

para protones que relajan muy velozmente, es menos eficaz, ya que se pueden realizar menos acumulaciones en un mismo tiempo. Esta secuencia es muy adecuada para realizar los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de  $\text{Co(II)Rc}$ , ya que existen muchos núcleos que relajan rápidamente y que se encuentran en la zona pseudodiamagnética y diamagnética.



**Figura 34.** Secuencia de pulsos *invsuperweft*.

Los valores que típicamente hemos utilizado para los tiempos  $d_1$ , el  $d_2$ , el  $d_3$  y el  $AQ$  son, respectivamente, 4, 142, 50 y 82 ms. Estos valores permiten eliminar completamente los protones con valores de  $T_1$  mayores de 100 ms.

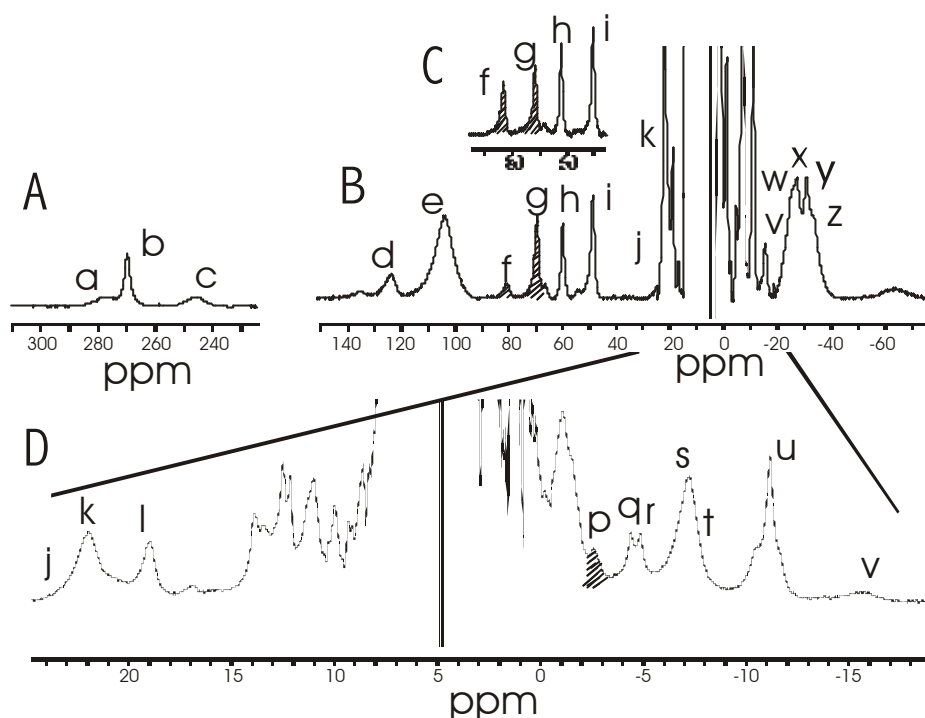
## 1.2. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de Cobalto(II)rusticianina

En la Figura 35 se muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de  $\text{Co(II)Rc}$  (3.6 mM, en tampón acetato 0.1 M, pH 6.0) obtenido con la secuencia de pulsos *invsuperweft*. Este espectro es muy parecido a los de todos los derivados sustituidos con cobalto(II) de las BCPs previamente estudiados<sup>185,189,191,192,195-198,230,245,246,349,381,382</sup>. Podemos dividir el espectro en dos regiones: una correspondiente a protones que experimentan grandes desplazamientos hiperfinos (Figura 35-A) y otra (entre  $-20$  y  $25$  ppm) denominada “pseudodiamagnética” (Figura 35-D). En la primera se encuentran señales con desplazamiento de contacto, es decir, señales que pertenecen a protones de los ligandos del ion metálico.

En la Figura 36 se representa de forma esquemática el centro activo de la rusticianina. En ella se resaltan específicamente los protones pertenecientes a los ligandos del metal. Estos protones deben corresponderse con las señales de la primera región del espectro. Como en los espectros de otras BCPs<sup>185,189,191,192,195-197,230,245,246,349,381,382</sup>, existen dos señales que desaparecen en  $\text{H}_2\text{O}$  (señales  $f$ ,  $g$ , Figura 35-C) siendo la intensidad de una de ellas (señal  $f$ ) muy dependiente del pH y/o de la temperatura.

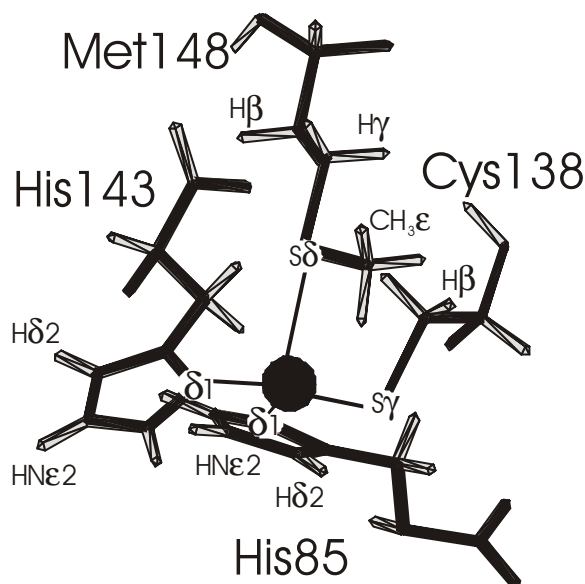
La región D corresponde típicamente a protones que sólo experimentan contribución dipolar (apartado 2.3 de Introducción). La gran dispersión de señales que se encuentra en esta zona indica un alto grado de anisotropía magnética del cobalto(II) en Rc. Como se ha comentado en la Introducción (apartado 2.5) esta anisotropía deriva, en un cobalto(II) tetracoordinado, del

acoplamiento espín-órbita (acoplamiento a campo cero) presente en casos de alta distorsión de la geometría ideal.



**Figura 35.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de  $\text{Co(II)Rc}$  en  $\text{H}_2\text{O}$  (tampón acetato 0.1 M, pH 6.0, 293 K): A) Región del espectro comprendida entre 300-220 ppm (muestra los protones  $\text{H}\beta$  de la Cys138 y el  $\text{H}\gamma_2$  de la Met148); B) Región del espectro comprendida entre 140 y -60 ppm (se observa el resto de señales con contribución de contacto, las señales sombreadas desaparecen en el espectro en  $\text{D}_2\text{O}$ ); C) Espectro de  $\text{Co(II)Rc}$  en  $\text{H}_2\text{O}$  a 278 K; D) Expansión del espectro entre 25 y -20 ppm (zona “pseudo-diamagnética”).

En la Tabla 8 se indican los desplazamientos químicos de estas señales así como sus tiempos de relajación longitudinal ( $T_1$ ) y sus anchuras a media altura,  $\Delta\nu_{1/2}$  (la asignación se justifica más adelante). Los valores de  $T_1$  para las señales de la región D (entre 3 y 13 ms, ver Tabla 9) no son excesivamente pequeños, lo cual indica una relajación electrónica muy efectiva (apartado 2.5 de Introducción). Los valores de  $\Delta\nu_{1/2}$  para estas mismas señales (entre 130 y 360 Hz) concuerdan con los valores de  $T_1$ . En definitiva, los valores de relajación nuclear de los protones, así como la dispersión de las señales en el espectro, confirman la existencia en nuestro sistema de estados excitados electrónicos que favorecen la relajación electrónica del ion metálico. Por lo tanto, el cobalto(II) en Rc, a pesar de ser tetracoordinado, muestra una geometría baja en simetría.



**Figura 36.** Esfera de coordinación del ion metálico en la rusticianina. Los átomos pesados se muestran en negro, mientras que los protones aparecen sombreados.

La analogía parcial del espectro de Co(II)Rc con los publicados previamente de otras Co(II)BCPs sirvió como punto de partida en la asignación de las señales. Ésta se realizó fundamentalmente en base a la concordancia entre los acoplamiento dipolares observados en los experimentos NOE 1D (Figura 37) y NOESY (Figura 38) y las distancias esperadas de acuerdo con las estructuras resueltas de Rc<sup>330,337,370</sup>.

A continuación se detalla el procedimiento seguido para la asignación del espectro en este trabajo. Con el propósito de realizar una presentación de resultados más clara, hemos numerado en dichos espectros (Figuras 37 y 38) las conectividades observadas. Así mismo, en la Figura 39 se representa la disposición relativa de los residuos cercanos al ion metálico y las conectividades dipolares observadas con la misma numeración.

#### a) Asignación de los residuos coordinados

En la Figura 37 se muestran los NOEs 1D de las señales con mayor desplazamiento hiperfino (*b*, *d-i* y *v*). Las señales *f* y *g* (sombreadas en las Figuras 35-B y C) desaparecen al realizar el espectro de Co(II)Rc en D<sub>2</sub>O. Esto indica que se trata de protones intercambiables con el disolvente, es decir, unidos a átomos de nitrógeno. Ambas señales poseen contribución de contacto, por lo que deben corresponder a residuos coordinados al ion cobalto(II), concretamente a los protones HNε2

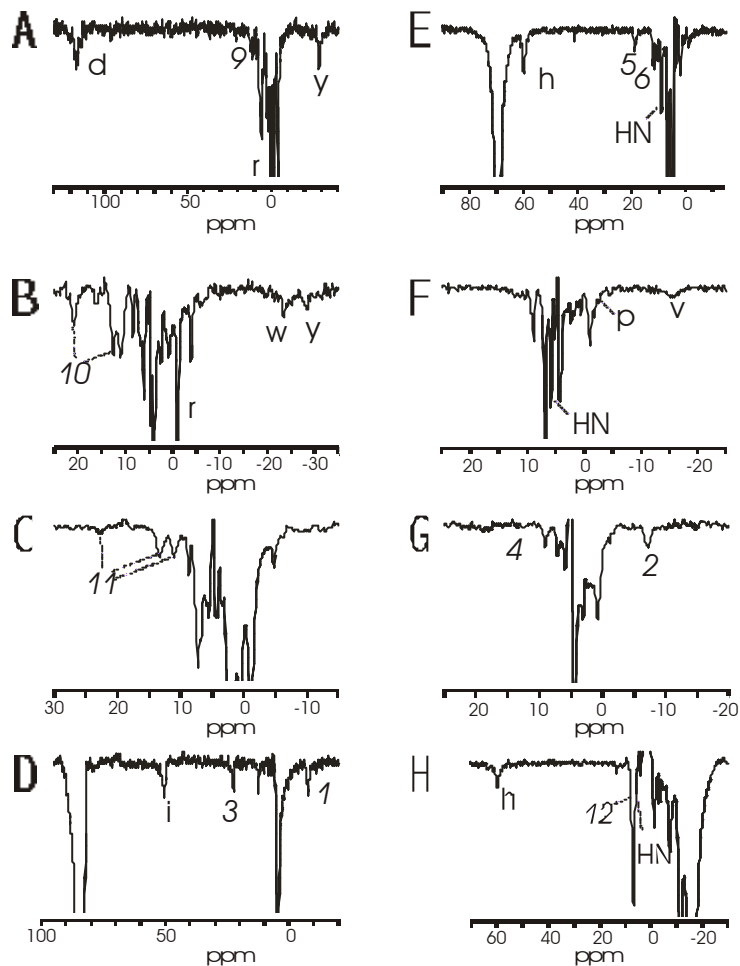
de las histidinas coordinadas (Figura 36). Por otro lado, la intensidad de la señal  $f$  disminuye al incrementar la temperatura y/o el pH. Este aumento en la velocidad de canje es indicativo de una mayor exposición al disolvente del protón correspondiente. En efecto, en las BCPs previamente sustituidas por cobalto(II)<sup>185,189,191,192,195-197,230,245,246,349,381,382</sup>, así como en las sustituidas por Ni(II)<sup>188,195,197,230</sup>, el protón H $\text{N}\epsilon$ 2 de la histidina más expuesta al disolvente (His143 en Rc) presenta este mismo comportamiento. En consecuencia, la señal  $f$  la asignamos al protón H $\text{N}\epsilon$ 2 de la His143 (Tabla 8). Cuando se satura la señal  $f$  (Figura 37-D) se observa, entre otros, un NOE sobre la señal  $i$ , que asignamos al protón H $\delta$ 2 de His143.

**Tabla 8.** Desplazamientos químicos y tiempos de relajación de protones que presentan contribución de contacto.

<i>Residuo</i>	<i>Protón</i>	<i>Señal</i>	$d^{\text{exp}}$ (ppm)	$T_1$ (ms)	$Dn_{1/2}$ (Hz)
His85	HN	-	5.70	-	-
	H $\beta$ 1	v	-15.78	4.3	380
	H $\delta$ 2	h	59.7	8.4	280
	H $\epsilon$ 2	g	69.2	3.5	430
Cys138	H $\beta$ 1	a	287	<0.4	~3000
	H $\beta$ 2	c	260	<0.4	~3000
His143	HN	-	8.95	-	-
	H $\delta$ 2	i	48.7	7.2	330
	H $\epsilon$ 2	f	80.3	1.5	620
Met148	HN		0.97	--	
	H $\alpha$		-1.58	--	
	H $\beta$ 1	y	-30.96	3.2	470
	H $\beta$ 2	w	-24.39	1.7	~400
	H $\gamma$ 1	d	122.9	1.0	1200
	H $\gamma$ 2	b	285.2	1.3	800
	CH $_3\epsilon$	e	103.3	1.2	1800
Ser86	HN	p	-2.57	14.0	200

El NOE observado entre la otra señal intercambiable,  $g$ , y la señal  $h$  (Figura 37-E) nos permite asignar estas dos señales respectivamente a los protones H $\text{N}\epsilon$ 2 y H $\delta$ 2 del ligando His85 (Figura 36). Así mismo, a partir del NOE entre las señales  $h$  y  $v$  (Figuras 37-F y H) asignamos esta

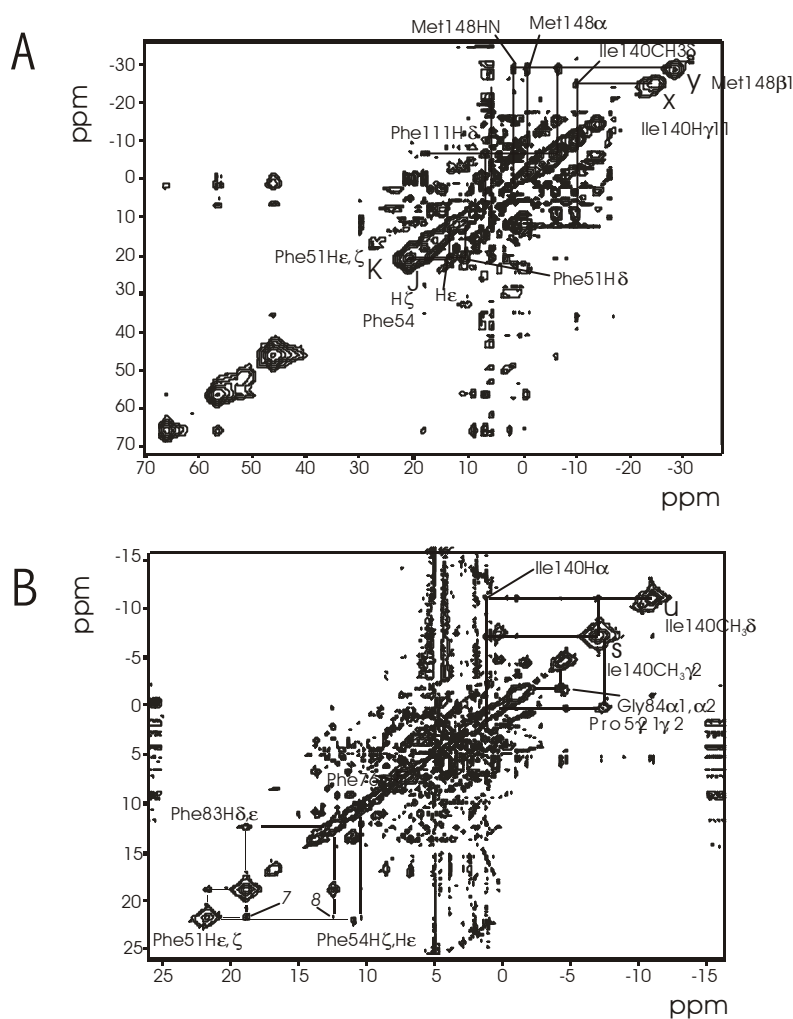
última señal al protón H $\beta$ 1 de His85. Los protones peptídicos HN de las histidinas se asignan a partir de los intensos NOEs que los protones H $\delta$ 2 de ambas histidinas (señales *h* e *i*) dan con sendos protones intercambiables (Figuras 37-F y G).



**Figura 37.** Espectros NOE 1D obtenidos tras irradiar: A) señal *b*, Met148 H $\gamma$ 2; B) señal *d*, Met148 H $\gamma$ 1; C) señal *e*, Met148 CH $\epsilon$ ; D) señal *f*, His143 HNe2; E) señal *g*, His85 HNe2; F) señal *i*, His143 H $\delta$ 2; G) señal *v*, His85 H $\beta$ 1. Los números en cursiva indican los NOEs observados, tal como se discute en el texto. Las escalas de las abscisas varían en función de los desplazamientos químicos observados.

La señal *e*, a 103.3 ppm, con un área tres veces mayor que el resto de las señales, se asigna inmediatamente al metilo CH $\epsilon$  de Met148.

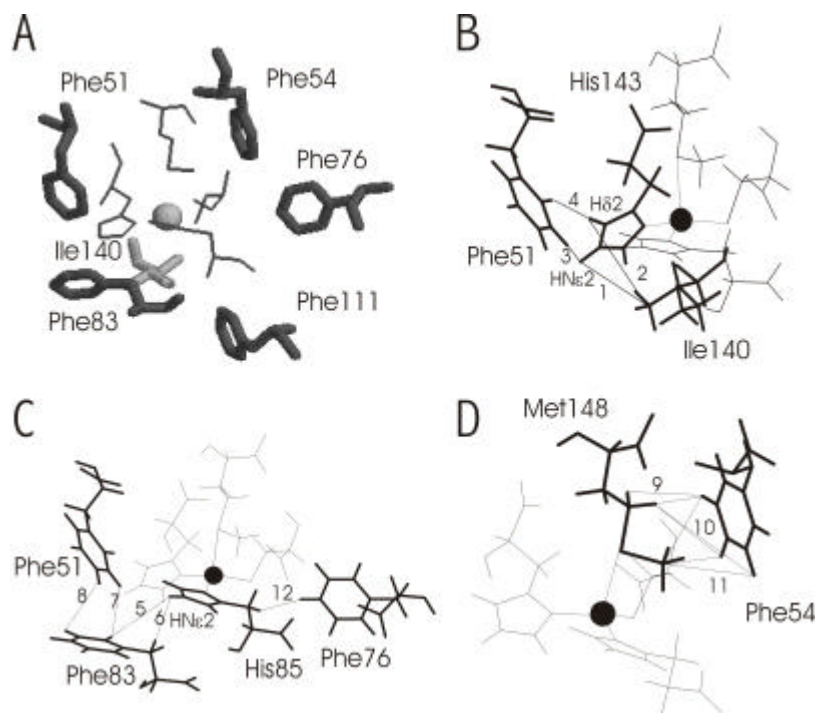




**Figura 38.** Espectros NOESY de Co(II)Rc (3.5 Mm, tampón acetato 0.1 M, pH 6.0, 293 K); A) en  $\text{H}_2\text{O}$  (tiempo de mezcla 7 ms); B) en  $\text{D}_2\text{O}$  (tiempo de mezcla 15 ms).

Las señales *a*, *b* y *c* se encuentran extremadamente desplazadas a campo bajo (Figura 35-A). Una contribución de contacto tan elevada sólo es posible para los protones situados a cuatro enlaces del ion metálico (Cys138  $\text{H}\beta$  y Met148  $\text{H}\gamma$ , Figura 36). La señal *b*, claramente más estrecha y con un valor de  $T_1$  mayor que las otras dos señales (Tabla 8), debe corresponder a uno de los protones  $\text{H}\gamma$  de la Met148. Efectivamente, según la estructura tridimensional de Rc<sup>330,370</sup>, los protones Met148  $\text{H}\gamma$  se encuentran a una distancia de 4.5 y 5.2 Å del ion metálico, mientras que los protones Cys138  $\text{H}\beta$  están a sólo 3.1-3.3 Å del mismo. La asignación se confirma también a partir de los experimentos NOE. De hecho, esta señal da un intenso NOE con la señal *d* (Figura 37-A) a

pesar de la anchura de ambas señales. Por lo tanto, las señales *b* y *d* deben corresponder a protones geminales. La señal *b* da también NOE con las señales *y* y *r* (Figura 37-A). Por otro lado, la señal *d* da NOE con las señales *r*, *w* e *y* (Figura 37-B). Los experimentos NOESY con tiempos de mezcla de 7 y 15 ms (Figuras 38-A y B, respectivamente) muestran, así mismo, conectividades dipolares entre las señales *r*, *w* e *y*. De estos experimentos se deduce que todas las señales deben corresponder al mismo sistema de espín, esto es, la Met148. La asignación estereoespecífica (Tabla 8) se justifica basándose en la concordancia entre los diferentes NOEs observados y esperados en la estructura tridimensional de Rc. Consecuentemente, las señales *a* y *c* se asignan a los protones geminales H $\beta$  de Cys138.



**Figura 39.** A) Esquema de la distribución de los residuos apolares cercanos al ion metálico (la Ile140 y las fenilalaninas 51, 54, 76, 83 y 111 están dibujadas con trazo más grueso). En el resto de las Figuras (B, C y D) se señalan los NOEs discutidos en el texto. Las coordenadas de la rusticianina se han tomado del archivo A3Z.pdb<sup>370</sup>. La numeración de los NOEs es la misma que en la Figura 37. En todas las Figuras se muestran los cuatro ligandos (con líneas más delgadas) para una mejor comprensión de la orientación relativa de los residuos.

### *b) Asignación de los residuos hidrofóbicos no coordinados*

Una isoleucina (Ile140) y otros cinco residuos aromáticos (las fenilalaninas 51, 54, 76, 83 y 111) presentan, según la estructura tridimensional de la rusticianina<sup>330,370</sup>, protones situados a

menos de 7.5 Å del ion metálico. En el presente trabajo hemos identificado sus correspondientes señales de resonancia. En la Tabla 9 se da la asignación de los protones pertenecientes a residuos no coordinados al ion metálico incluidos los de la Ile140.

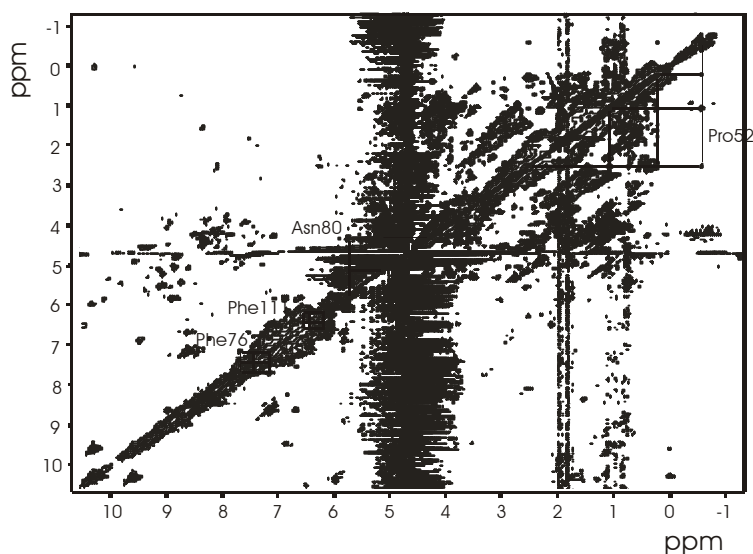
**Tabla 9.** Desplazamientos químicos y tiempos de relajación de protones pertenecientes a residuos hidrofóbicos cercanos al metal.

<i>Residuo</i>	<i>Protón</i>	<i>Señal</i>	$d^{exp}$ (ppm)	$T_1$ (ms)	$Dn_{1/2}$ (Hz)
Phe51	H $\delta$		12.3	-	
	H $\epsilon$ , $\zeta$	k	21.84	7.9	390
Phe54	H $\delta$		10.98	-	
	H $\epsilon$		13.17	-	
	H $\zeta$	j	22.10	6.5	
Phe76	H $\delta$		7.62	-	
	H $\epsilon$		7.16		
	H $\zeta$		7.40		
Phe83	H $\beta$ 1		9.07	-	
	H $\beta$ 2		12.1		
	H $\delta$	l	18.81	11.5	210
	H $\epsilon$		12.35		
Phe111	H $\delta$		6.71		
	H $\epsilon$		6.20		
Ile140	H $\alpha$		1.22		
	CH $_3\gamma$ 2	s	-7.25	8.7	300
	H $\gamma$ 11	x	-27.38	3.2	530
	H $\gamma$ 12	z	-34.35	1.7	670
	CH $_3\delta$	u	-11.24	13.0	130

En la zona de campo alto aparecen dos señales con triple intensidad (señales *s* y *u*, Figura 35-C), lo que indica la presencia de dos grupos metilo muy cercanos al ion metálico. Basándonos en la estructura tridimensional de Rc<sup>330,370</sup>, llegamos a la conclusión de que deben corresponder a los metilos CH $_3\gamma$  y CH $_3\delta$  de Ile140 (Figura 37-A). Las señales *x* y *z* dan NOE entre ellas y sendos picos de cruce muy intensos con las dos señales de los metilos en el espectro NOESY (Figura 38-A). Estas

conectividades sugieren que todas estas señales pertenecen al mismo sistema de espín. Por lo tanto, a falta del protón  $H\beta$ , cuya distancia al ion metálico es menor a 3.2 Å, se ha identificado prácticamente todo el sistema de espín de esta Ile140 (Tabla 9).

Los NOEs entre los protones  $H\epsilon_2$  y  $H\delta_2$  de la His143 con el metilo  $CH_3\delta$  de Ile140 (NOEs 1 en la Figura 37-D y Figura 39-B y 2 en Figura 37-G y Figura 39-B), así como los picos de cruce en los experimentos NOESY (Figura 38) corroboran la asignación. El experimento TOCSY realizado con un tiempo de mezcla de 30 ms (Figura 40) está de acuerdo con la asignación presentada, a pesar de que los picos de cruce esperados de las señales  $s$ ,  $u$  y  $z$  se pierden debido a la anchura de las señales.



**Figura 40.** Espectro TOCSY con un tiempo de mezcla de 30 ms de Co(II)Rc (mismas condiciones que en la Figura 35).

En la zona de campo bajo la señal  $k$ , de triple intensidad (Figura 35), no se resuelve a ningún intervalo de pH ni de temperatura, lo cual indica que los tres protones corresponden a un único sistema de espín. Esta señal debe corresponder a los protones aromáticos  $H\epsilon$  y  $H\xi$  de un anillo de fenilalanina puesto que no hay ningún otro grupo metilo lo suficientemente cerca del ion metálico como para experimentar un desplazamiento hiperfino tan grande. La señal  $f$  da NOE con la señal  $k$  (NOE marcado como 3 en la Figura 37-D), esperado entre los protones  $H\epsilon_2$  de la His143 y los  $H\epsilon$  y  $H\xi$  de la Phe51 (Figura 39-B). El intenso pico de cruce observado en el NOESY con 7 ms de tiempo de mezcla (Figura 38-A) entre la señal  $k$  y una señal a 12.3 ppm nos permite asignar los protones  $H\delta$  de la Phe51. El NOE observado entre la señal  $i$  y la señal a 12.3 ppm (esperado entre

los protones  $\text{H}\delta_2$  de la His143 y  $\text{H}\delta$  de la Phe51, NOE 4 en la Figura 37-G y Figura 39-B) confirma la asignación.

La His85 se encuentra lo suficientemente cerca de la Phe83 como para originar una conectividad dipolar con los protones de su anillo aromático. La señal  $g$  ( $\text{H}\epsilon_2$  de la His85) da un NOE con la señal  $l$ , de doble intensidad y con una señal a 12.1 ppm (NOEs 5 y 6, Figura 37-E y Figura 39-C). El análisis de los experimentos NOESY y TOCSY (Figuras 38 y 40) indica que esas señales deben provenir de los protones  $\text{H}\delta$  y  $\text{H}\beta_2$  de la Phe83. La asignación se confirma por varias conectividades dipolares observadas entre los anillos aromáticos de la Phe51 y Phe83 en el experimento NOESY (NOEs 7 y 8 de la Figura 38-B).

De modo similar se asigna la Phe54 cercana al ligando Met148. En la Figura 39-D se marcan con los números del 9 al 11 las conectividades dipolares esperadas entre estos dos aminoácidos. Los NOEs experimentales están marcados con los mismos números en las Figuras 37-A y C. Los NOEs del protón  $\text{H}\gamma_1$  y del metilo  $\text{CH}_3\epsilon$  de Met143 con el protón  $\text{H}\xi$  nos permiten identificar la señal  $j$ , un protón que relaja rápidamente y se encuentra oculto debajo de la señal  $k$ . Las anchuras a media altura de los picos de cruce que implican a la Phe54 indican claramente que el anillo aromático de la fenilalanina está en intercambio lento en la escala de tiempos de RMN respecto al desplazamiento químico a 20 °C.

La Phe76 se identifica a partir de los NOEs observados con el protón  $\text{H}\beta_1$  de la His85 (NOE 12 de la Figura 37-H y en la Figura 39-C). Finalmente, la asignación de la Phe111 se consigue a partir del NOE obtenido con el  $\text{CH}_3\delta_2$  de Ile140 y una señal a 6.71 ppm. Para estos dos aminoácidos (Phe76 y Phe111) los experimentos TOCSY corroboran satisfactoriamente las asignaciones (Figura 40).

### c) Otras asignaciones

La señal  $p$ , señal intercambiable y desplazada a campo alto, se asigna al protón HN de Ser86 debido a las conectividades observadas con los protones  $\text{H}\delta_2$  y  $\text{H}\beta_1$  de la His85 (Figuras 37-F y H).

Los protones de los aminoácidos: Ala44, Val45, Pro52, Ser53, Asn80, Gly84 y Gly142 se asignaron a partir de las conectividades con los residuos asignados previamente.

La asignación que hemos realizado para los protones, cercanos al ion metálico en el derivado  $\text{Co(II)Rc}$ , está de acuerdo con las estructuras previamente resueltas<sup>330,370</sup>. Como estas últimas se han determinado siempre para el ion nativo, cobre(II), se deduce que tanto los átomos dadores como la geometría y todo el entorno de coordinación del ion metálico es muy parecido en  $\text{CuRc}$  y  $\text{Co(II)Rc}$ .

### 1.3. Susceptibilidad Magnética del Ion Cobalto(II)

Hemos asignado 34 protones pertenecientes a residuos cercanos al metal pero no coordinados al mismo y que, por lo tanto, sólo presentan contribución de pseudocontacto. En la Tabla 10 se dan los valores dipolares experimentales (ecuaciones 4 y 5) para estos 34 protones.

**Tabla 10.** Desplazamientos químicos experimentales y calculados de acuerdo con la ecuación 7 aplicando el programa FANTASIA<sup>228</sup> para los protones asignados.

<i>Aminoácido</i>	<i>Protón</i>	<i>Contribución Dipolar Experimental (<math>d^{exp} - d^{dia}</math>)</i>	<i>Contribución Dipolar Calculada</i>
Ala44	H $\alpha$	-2.63	-3.15
	CH <sub>3</sub> $\beta$	-2.53	-3.09
Val45	CH <sub>3</sub> $\gamma$ 2	-0.43	-1.32
Phe51	H $\epsilon$ , $\zeta$	14.78	13.94
	H $\delta$	5.05	5.045
Pro52	H $\gamma$ 1	-9.49	-10.28
	H $\gamma$ 2	-1.79	-2.57
	H $\delta$ 1	-3.68	-3.55
	H $\delta$ 2	-1.18	-1.00
Ser53	HN	-4.17	-6.86
	H $\alpha$	-9.09	-8.81
	H $\beta$ 1	-3.58	-3.64
	H $\beta$ 2	-3.80	-3.61
Phe54	H $\zeta$	16.44	16.81
	H $\epsilon$	3.71	3.71
	H $\delta$	3.86	-1.61
Phe76	H $\zeta$	0.61	0.06
	H $\epsilon$	0.26	-0.20
	H $\delta$	0.70	0.33
Asn80	H $\alpha$	-0.21	-1.32
	H $\beta$ 1	0.68	1.12
	H $\beta$ 2	3.32	2.27

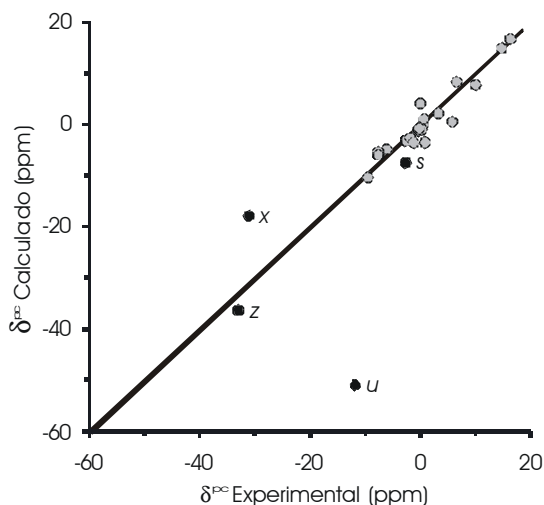
**Tabla 10 (continuación).** Desplazamientos químicos experimentales y calculados para los protones asignados.

<i>Aminoácido</i>	<i>Protón</i>	<i>Contribución Dipolar Experimental (<math>d^{\text{exp}} - d^{\text{dia}}</math>)</i>	<i>Contribución Dipolar Calculada</i>
Phe83	H $\beta$ 1	10.06	8.42
	H $\beta$ 2	6.66	5.63
	H $\delta$	11.56	5.55
	H $\epsilon$	5.05	4.55
	H $\zeta$	0.05	4.24
Gly84	H $\alpha$ 1	-6.05	-5.68
	H $\alpha$ 2	-7.63	-6.20
Phe111	H $\delta$	-1.00	-3.48
	H $\epsilon$	-0.96	-1.61
	H $\zeta$	-0.78	-1.20
Gly142	H $\alpha$ 1	0.29	-1.14
	H $\alpha$ 2	-0.13	-0.95

A partir de estos desplazamientos dipolares y utilizando el programa FANTASIA<sup>228</sup>, hemos obtenido la orientación de los ejes principales del tensor de susceptibilidad magnética de Co(II)Rc, así como la magnitud de sus componentes axial,  $\Delta\chi_{\text{ax}}$ , y rómbica,  $\Delta\chi_{\text{rh}}$ . En la Figura 41 se muestran los desplazamientos dipolares experimentales en función de los calculados para estos 34 protones. Si eliminamos los protones de Ile140 del análisis (apartado 1.6) llegamos a un buen ajuste entre los valores calculados y los experimentales, con un buen valor para el coeficiente de regresión lineal (0.93).

Los valores de  $\Delta\chi_{\text{ax}}$  y de  $\Delta\chi_{\text{rh}}$  son algo elevados para un complejo tetraédrico o tetracoordinado de alta simetría. En los complejos de cobalto(II) con simetría tetraédrica, el estado fundamental es un término  $^4A_2$  no degenerado orbitalmente. En estos casos la anisotropía magnética esperada es muy baja y, consecuentemente, se observaría una dispersión muy pequeña en la región pseudodiamagnética del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (apartado 2.5 de Introducción). Éste no es nuestro caso. A pesar de que el cobalto(II) se encuentra tetracoordinado, en el presente sistema existen pocos elementos de simetría y, en consecuencia, un alto desdoblamiento a campo cero (Capítulo 2 de Introducción). Todo ello origina un alto grado de anisotropía magnética. Por lo tanto, el ion cobalto(II) en Rc se define mejor con una simetría  $C_3$  que con una geometría tetraédrica. Nuestros datos de RMN

confirman pues que no sólo la esfera de coordinación, sino también la geometría del ion cobalto en Rc, es análoga a la del cobre en la proteína nativa.



**Figura 41.** Representación de los valores de los desplazamientos dipolares experimentales en función de los calculados para protones pertenecientes a residuos no coordinados al ion metálico. Los puntos marcados en negro corresponden a los protones de la lle140 (señales *u*, *s*, *x*, *z*). Estos protones no han sido incluidos en los cálculos (apartado 1.6).

En la Tabla 11 se dan los ángulos que los ejes principales del tensor de susceptibilidad magnética forman con los enlaces entre el metal y los átomos coordinados. También se incluyen las componentes principales de la anisotropía de la susceptibilidad magnética. En la Figura 42 se muestra la orientación de los ejes con respecto a los cuatro enlaces del ion cobalto. En ambos casos se reproducen también los datos análogos para la azurina de cobalto(II) (obtenidos de la referencia 230).



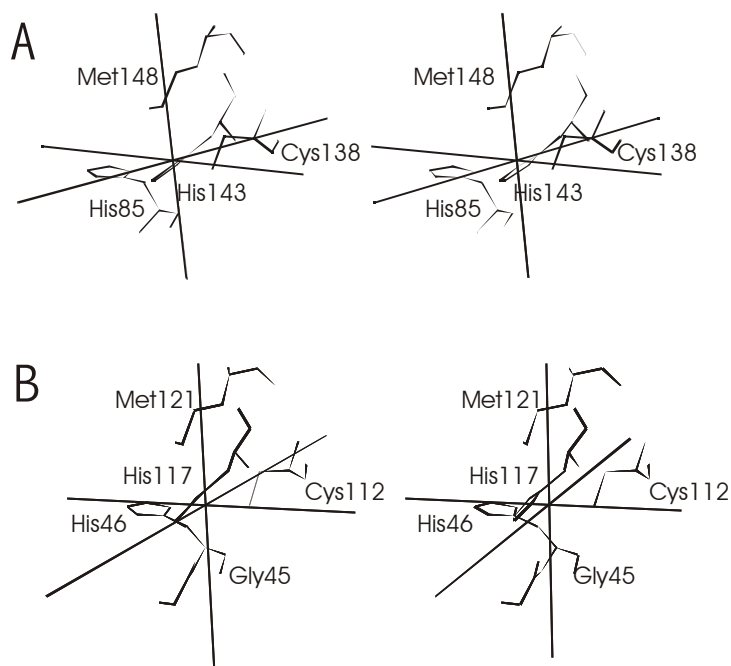
**Tabla 11.** Ángulos (en grados) de los ejes principales del tensor de susceptibilidad magnética con respecto a los enlaces entre el ion metálico y los átomos coordinados al cobalto (II) en la rusticianina<sup>a</sup> y en la azurina<sup>b</sup>.**CoRc**

	<i>Met148 Sd</i>	<i>Cys138 Sg</i>	<i>His85 Nd1</i>	<i>His143 Nd1</i>
$\chi_{xx}$ (°)	73 ± 4	100 ± 4	37 ± 4	139 ± 4
$\chi_{yy}$ (°)	99 ± 4	155 ± 4	55 ± 4	49 ± 4
$\chi_{zz}$ (°)	160 ± 5	68 ± 5	80 ± 5	94 ± 5
$\Delta\chi_{ax}$ ( $\text{m}^3 \times 10^{32}$ )	-5.3 ± 0.3			
$\Delta\chi_{rh}$ ( $\text{m}^3 \times 10^{32}$ )	-5.1 ± 0.3			

**CoAz**

	<i>Met121 Sd</i>	<i>Cys112 Sg</i>	<i>His46 Nd1</i>	<i>His117 Nd1</i>
$\chi_{xx}$ (°)	92 ± 4	96 ± 4	37 ± 4	139 ± 4
$\chi_{yy}$ (°)	83 ± 5	174 ± 5	54 ± 5	51 ± 5
$\chi_{zz}$ (°)	159 ± 4	91 ± 4	95 ± 4	81 ± 4
$\Delta\chi_{ax}$ ( $\text{m}^3 \times 10^{32}$ )	-6.8 ± 0.3			
$\Delta\chi_{rh}$ ( $\text{m}^3 \times 10^{32}$ )	2.8 ± 0.1			

<sup>a</sup> Se dan también las componentes de la anisotropía de susceptibilidad magnética. <sup>b</sup> Los valores de la azurina se han obtenido de la referencia 230.



**Figura 42.** Vista en estéreo de los principales ejes del tensor de susceptibilidad magnética con respecto a los enlaces metal-ligando para: A) Co(II)Rc y B) Co(II)Az<sup>230</sup>.

En la Figura 43 se muestra la forma que presentan las superficies de isopseudocontacto en Co(II)Rc (apartado 2.3 de Introducción). Los valores de las componentes de anisotropía de la susceptibilidad magnética para Co(II)Rc nos indican que esta superficie tendrá una forma que recuerda la de un orbital  $d_{z^2}$  pero con una contribución rómbica importante. En la región axial de estas superficies (color rojo, Figura 43) se disponen los residuos con desplazamiento de pseudocontacto negativo, mientras que en la región ecuatorial (color magenta, Figura 43) se disponen los residuos con contribución positiva al desplazamiento dipolar.



**Figura 43.** Representación gráfica de las superficies de iso-pseudocontacto en Co(II)Rc (axial).

#### **1.4. Residuos con Contribución de Contacto**

Una vez calculado el tensor de anisotropía magnética del metal, se puede determinar la contribución de pseudocontacto para los protones que también tienen contribución de contacto (apartado 2.3 de Introducción). En la Tabla 12 se muestran estos valores. Entre éstos se encuentran los ligandos del metal y los protones pertenecientes a Ser86. A continuación se hace un análisis de la contribución electrónica para estos aminoácidos.

##### *a) Ligandos histidinas*

Los protones pertenecientes a los anillos de imidazol aparecen entre los 45 y los 80 ppm en la rusticianina (Tabla 8), desplazamientos típicos de estos protones en los metaloderivados de cobalto(II) de BCPs<sup>189,191,192,195-197,230,245,246,349,381,382</sup>.

**Tabla 12.** Contribuciones dipolares y de contacto de los desplazamientos hiperfinos de los protones pertenecientes a los residuos coordinados al cobalto(II)<sup>a</sup> en los derivados de rusticianina y azurina.

<i>Residuo</i>	<i>Protón</i>	<b>Co(II)Rc</b>		<b>Co(II)Az</b>	
		$d^{dip}$ (ppm)	$d^{con}$ (ppm)	$d^{dip}$ (ppm)	$d^{con}$ (ppm)
Gly84(45) <sup>b</sup>	HN			-9.80	10.7
	H $\alpha$ 1			-10.53	54.2
	H $\alpha$ 2			-26.71	-5.9
His85(46)	HN	-11.8	11.47	-11.22	-6.1
	H $\beta$ 1	-8.5	-11.22	7.08	5.6
	H $\delta$ 2	-1.9	53.6	7.75	37.3
	H $\epsilon$ 2	10.3	44.2	16.56	46.9
Cys138(112)	H $\beta$ 1	69.9	205	5.38	223.2
	H $\beta$ 2	59.7	184	-5.27	287.4
His143(117)	HN	-3.79	1.1	2.56	3.2
	H $\delta$ 2	3.4	38.5	7.18	42.3
	H $\epsilon$ 2	19.9	48.9	7.47	46.8
Met148(121)	HN	-6.3	-1.6	-5.52	-1.8
	H $\alpha$	-7.37	1.75	-9.93	2.5
	H $\beta$ 1	-23.2	-9.8	-25.93	5.3
	H $\beta$ 2	-13.5	-17.4	-26.85	6.1
	H $\gamma$ 1	-11.5	132.5	-19.53	64.4
	H $\gamma$ 2	-19.2	301.6	-20.22	-0.3
	CH <sub>3</sub> $\epsilon$	-16.9	130.3	-31.21	24.0
Ser86(Asn47)	HN	15.9	-26.5	30.1	-33.6
	H $\alpha$			5.36	5.3

<sup>a</sup> En la Tabla se incluyen los protones de Ser86, que también poseen contribución de contacto. <sup>b</sup> Los números entre paréntesis indican los residuos equivalentes en azurina.

Las señales observadas son relativamente estrechas (280-620 Hz en Co(II)Rc, Tabla 8); la anchura de la señal es mayor cuanto más cercano está el protón al metal (en ambas His la señal más ancha es la del protón H $\epsilon$ 1), lo que nos indica que el principal mecanismo de relajación de estos protones es dipolar. No obstante, no existe una buena correlación de la distancia al metal de

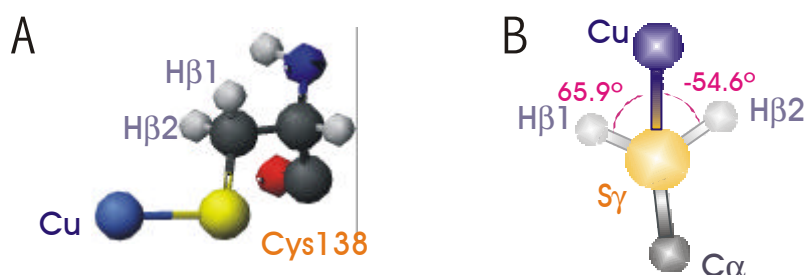
estos protones imidazol frente a las velocidades de relajación y, en consecuencia, la relajación de contacto no es despreciable. El desplazamiento observado proviene también de diversos mecanismos. De hecho, tanto el mecanismo de transferencia directa como el de polarización de espín<sup>100,106,108,223</sup> (Capítulo 2 de Introducción) son operativos y de similar magnitud a través de enlaces  $\pi$ . Este hecho, ya descrito para anillos imidazólicos<sup>521,522</sup>, dificulta enormemente la interpretación teórica, incluso sólo cualitativamente, de los desplazamientos hiperfinos para los protones de las histidinas.

### *b) Ligando cisteína*

Las señales de los protones  $\text{H}\beta$  de la cisteína suelen reconocerse fácilmente porque son las más desplazadas en el espectro (287 y 260 ppm, Figura 35-A) y también las más anchas ( $\sim 3000$  Hz), aunque es precisamente esta característica lo que dificulta su detección. En la misma Figura podemos observar otra señal más, que corresponde al  $\text{H}\gamma 2$  de la metionina (ver más adelante), que presenta una anchura de banda menor.

La contribución dipolar al desplazamiento químico de ambos protones es muy parecida (69.9 ppm para el  $\text{H}\beta 1$  y 59.7 ppm para  $\text{H}\beta 2$ ) porque la distancia al cobalto(II) es prácticamente la misma y ambos protones presentan una orientación muy similar respecto al tensor de anisotropía magnética del metal. Una vez conocida la contribución dipolar, calculada mediante la ecuación 2.7, la contribución de contacto (ecuaciones 4 y 5) resulta ser de 205 y 184 ppm, respectivamente (Tabla 12).

Los desplazamientos de contacto de estas señales son consecuencia de la densidad de electrón desapareado que reside sobre estos protones. Por lo tanto, dependen fundamentalmente del solapamiento que hay entre los orbitales del ion metálico y los del azufre de la cisteína, pero también de cómo se transmite esa densidad de espín a través de los enlaces químicos y, por lo tanto, de la orientación de la cadena lateral del ligando cisteína. En sistemas que poseen iones metálicos unidos a cisteínas se ha relacionado la diferencia en el desplazamiento químico de los protones- $\beta$  de cisteína con el ángulo diedro  $\text{M-S-C}\beta\text{-H}\beta$ <sup>457</sup>, donde M es el ion metálico (Figura 44). En  $R_c$  la magnitud de estos dos ángulos difieren relativamente poco ( $65.9^\circ$  para el  $\text{H}\beta 1$ , y  $-54.6^\circ$  para el  $\text{H}\beta 2$ )<sup>330</sup>. Debido a ello la diferencia entre los desplazamientos de contacto de los dos protones es, relativamente, mínima.



**Figura 44.** Representación gráfica de los ángulos diedros M-S $\gamma$ -C $\beta$ -H $\beta$  en Rn<sup>330</sup>: A) Posición que ocupa la Cys138 con respecto al metal; B) Proyección de Newman.

### c) *Ligando axial*

En la Tabla 12 se muestran las diferentes contribuciones al desplazamiento químico para los protones de la Met148. Como se observa, el desplazamiento de pseudocontacto es negativo para todos ellos, lo que nos indica que todos estos protones se sitúan próximos al eje z del tensor. El mismo comportamiento se ha observado en CoAz<sup>230</sup>.

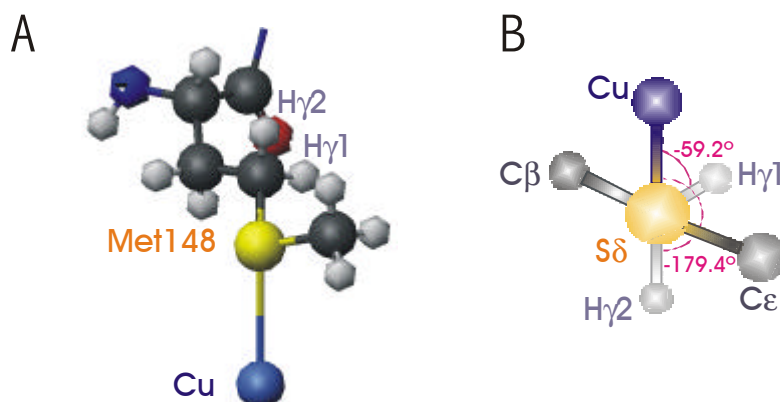
Las señales de los protones H $\gamma$  de la Met148 tienen una contribución de contacto muy alta (Tabla 12), esto indica un alto grado de covalencia en la interacción Co-S $\delta$ Met148. Ésta es una evidencia experimental directa de que existe un enlace covalente, que además es relativamente fuerte, entre el ion metálico y el ligando axial.

Cabe destacar también que las señales de estos dos protones presentan desplazamientos de contacto muy diferentes (132.5 y 301.6 ppm H $\gamma$ 1 y H $\gamma$ 2 respectivamente, Tabla 12). Como se ha comentado en el apartado anterior, esta diferencia es debida a la distinta densidad de espín desapareado que reside en cada uno de los protones geminales. A su vez, esta densidad de espín depende del valor del ángulo diedro M-S $\delta$ -C $\gamma$ -H $\gamma$  para cada uno de los dos protones mediante la siguiente relación de Karplus<sup>523</sup>:

$$\mathbf{d} = (\cos^2 \mathbf{q} + a \cos \mathbf{q} + b) \mathbf{A} \mathbf{r}_s \quad [41]$$

donde  $a$ ,  $b$ , y  $A$  son constantes,  $\mathbf{q}$  es el ángulo diedro M-S $\delta$ -C $\gamma$ -H $\gamma$  y  $\mathbf{r}_s$  es la densidad de espín electrónico localizado en el átomo de azufre. En la mayoría de los casos  $a$  y  $b$  son despreciables y la dependencia es directa con el coseno cuadrado de  $\mathbf{q}$ <sup>230</sup>. Cuando los únicos enlaces implicados en la deslocalización de espín son de tipo  $\mathbf{s}$  como es el caso de CoAz<sup>230</sup>, entonces la dependencia angular vendrá dada por el coseno. Si, por el contrario, existen enlaces  $\mathbf{p}$  implicados en la transferencia de espín desapareado, existirá una dependencia con el seno del ángulo  $\mathbf{q}$ . En este último caso se encuentran proteínas hierro-azufre como las-ferredoxinas y HiPIPs<sup>457,524,525</sup>. En la Figura 45 se muestran los ángulos diedros M-S $\delta$ -C $\gamma$ -H $\gamma$  para cada uno de los dos protones

metilénicos de acuerdo con la estructura de rayos X de Cu(II)Rc (1RCY.pdb<sup>330</sup>). Los valores de estos ángulos son  $-59.2^\circ$  y  $-179.4^\circ$  respectivamente.



**Figura 45.** Representación gráfica de los ángulos diedros M-S $\delta$ -C $\gamma$ -H $\gamma$  en Rc<sup>330</sup>: A) Posición que ocupa la Met148 con respecto al metal; B) Proyección de Newman.

#### d) *Serina86*

En la Tabla 8 se muestran los desplazamientos químicos de los protones de la Serina86. Estos desplazamientos experimentales sólo pueden explicarse sobre la base de la existencia de una importante contribución de contacto para los correspondientes protones. Examinando las estructuras tridimensionales de Rc<sup>330,370</sup> se observa que el protón peptídico HN de esta serina forma un enlace de hidrógeno con el azufre S $\gamma$  de la Cys 138. Como previamente se había observado en CoAz<sup>230,377</sup>, la transferencia de densidad de espín electrónico desapareado se produce a través de este enlace de hidrógeno. Este hecho se confirmó posteriormente también en las proteínas nativas Pc<sup>199</sup>, Az<sup>373</sup> y St<sup>373</sup> en sus formas oxidadas. Así mismo, nosotros también lo hemos confirmado para Rc (Capítulo 2) y, en colaboración con el Dr. Vila (Universidad de Rosario), para PsAz<sup>374</sup>. Es interesante destacar que el aminoácido equivalente en esta posición en las demás BCPs (aminoácido posterior al primer ligando histidina, HisN) es una asparragina. Precisamente esta particularidad de la rusticianina se ha propuesto<sup>368</sup> como uno de los factores determinantes de su alto potencial redox (apartado 1.7). El hecho de que los protones de este aminoácido sientan contribución de contacto indica que, efectivamente, este aminoácido modifica la estructura electrónica del metal y, por lo tanto, la diferente estabilidad de sus estados redox.

### 1.5. Comparación de Co(II)Rc con otras Co(II)BCPs

Hemos comparado los resultados presentes para Co(II)Rc con los previamente obtenidos en nuestro laboratorio para Co(II)Az<sup>230</sup>. En la Tabla 11 y en la Figura 42 se muestran los datos obtenidos para ambas proteínas.

La orientación del eje principal del tensor de susceptibilidad magnética (eje *z*) es similar en Co(II)Rc y Co(II)Az. Ambos ejes se desvían solamente 20 y 21°, respectivamente, con respecto al vector definido por el enlace Co-SδMet. Esta orientación parecida nos indica también un alto grado de similitud en la estructura electrónica de ambas proteínas metalosustituidas. Sólo la orientación de los ejes *x* e *y* se ve modificada. Dado que la magnitud de estas dos componentes es claramente menor que la axial y que el signo del desplazamiento de pseudocontacto (ecuación 7) no depende de la orientación de los ejes ecuatoriales, se deduce que el desplazamiento dipolar es muy similar para ambos derivados de cobalto(II).

Los protones correspondientes a los ligandos histidinas presentan un patrón muy similar en todas las BCPs, tanto en lo que respecta a desplazamiento como a anchura de banda, es decir, la distribución de densidad electrónica en los anillos imidazol es muy similar en todas ellas. Todo esto indica que el modo y la magnitud de la interacción del metal con las histidinas son prácticamente iguales en todas las BCPs. La similitud de la interacción metal-histidina en todas las BCPs se mantiene también en la proteína nativa (Capítulo 2). Este es un argumento añadido que corrobora, por un lado, la idoneidad del cobalto(II) como una buena sonda para el estudio de las BCPs y, por otro, la hipótesis del modelo de *rack*<sup>260,296,298</sup> o de estado *entático*<sup>342,343</sup> aplicado a las BCPs (Capítulo 3 de Introducción).

La contribución de contacto de los protones Hβ del ligando Cys es menor en Co(II)Rc que en Co(II)Az (Tabla 12), lo que está de acuerdo con una menor interacción Co-SγCys en el primer derivado. Para evitar la dependencia angular de los desplazamientos químicos de estos protones (apartado 1.4) se ha propuesto la media  $\delta^{1/2} = (\delta^{\text{conH}\beta 1} + \delta^{\text{conH}\beta 2})/2$  como una medida de la fuerza de la interacción metal-SγCys<sup>193</sup>. Este valor es un 20% mayor para Co(II)Az que para Co(II)Rc indicando una covalencia mayor en la misma proporción.

Los desplazamientos químicos de los protones de la metionina axial (Met148 en Rc y Met120 en Az) muestran grandes diferencias en ambos derivados. La contribución de contacto de los protones Hy1 y Hy2 de este mismo residuo presenta valores mucho más altos en Co(II)Rc (132.5 y 301.6 ppm, respectivamente, Tabla 12) que en Co(II)Az (64.4 y -0.3 ppm, respectivamente). De aquí se deduce que la metionina axial está ligada con más fuerza al metal en la rusticianina que en la azurina. De hecho, la distancia Metal-SδMet en la rusticianina nativa es 2.89 Å, mientras que en la azurina es 3.26 Å. La contribución de contacto media<sup>230</sup>,  $\delta^{1/2} = (\delta^{\text{conHy}1} + \delta^{\text{conHy}2})/2$  para los dos protones metilénicos Hy de Met148 es 216 ppm (Tabla 12). La comparación de este valor con el obtenido



para los protones Met120Hy de Co(II)Az (32 ppm, ver Tabla 12) indica que el grado de covalencia del enlace Co-S $\delta$  de la metionina axial es seis veces mayor en la Co(II)Rc que en la Co(II)Az.

El desplazamiento hiperfino de los protones metílicos CH $_3\epsilon$  de Met148 es independiente del ángulo M-S $\delta$ -C $\epsilon$ -H $\epsilon$  puesto que la dependencia angular se promedia en el tiempo. Por lo tanto, podemos estimar un valor medio para la contribución covalente de 65 ppm para Co(II)Rc mientras para Co(II)Az la contribución análoga es de 12 ppm (Tabla 12). Esto significa que la covalencia del enlace Co-S $\delta$  de la metionina axial es cinco veces más fuerte en Co(II)Rc que en Co(II)Az, lo que es consistente tanto con los valores encontrados para los protones Hy Met como con las distancias encontradas para el ion nativo<sup>230,330</sup> (Figura 8 y Tabla 4).

Aun cuando la interacción entre el ion metálico y la metionina es completamente diferente en Co(II)Rc y Co(II)Az, la orientación del tensor de susceptibilidad magnética (Figura 42) y, por lo tanto, la estructura electrónica del ion cobalto(II) es esencialmente la misma para las dos proteínas. En consecuencia, la diferencia en la fuerza de la interacción axial no altera la estructura electrónica del ion metálico.

Como ya se explicó en la introducción, la azurina presenta un quinto ligando axial, el oxígeno carbonílico de la Gly45 (aminoácido anterior al primer ligando en Az, Figura 8). Los protones de este aminoácido presentan también contribución de contacto y por ello se incluyen en la Tabla 12. En contraste con estos valores, la contribución de contacto en la Gly84 (aminoácido equivalente en Rc) de la rusticianina es despreciable, indicando que el grupo carbonilo de este aminoácido no está coordinado al cobalto(II). Esto confirma que el cobalto(II) en la rusticianina tiene la misma coordinación que el cobre(II) en la proteína nativa (Figura 36). Esta coordinación, tanto en la rusticianina nativa como en el derivado de cobalto(II), es diferente a la que presenta la azurina. Todos los resultados obtenidos en el presente trabajo para los derivados de cobalto de Rc y Az son consistentes con los datos estructurales para las proteínas nativas.

El protón HN de Ser86 (Asn47 en Co(II)Az) tiene contribución de contacto negativa en ambas metaloproteínas. Por lo tanto, aunque la carga de estos dos aminoácidos es distinta en Co(II)Rc y Co(II)Az (Ser y Asn), la contribución a la estructura electrónica del metal es semejante. Esto indica que este enlace de hidrógeno, aunque contribuye, no es el factor determinante en el alto potencial redox de la rusticianina.

Además de CoAz, se han publicado los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de los derivados de cobalto(II) de la amicianina, Co(II)Am<sup>197</sup>, de la pseudoazurina, Co(II)PsAz<sup>246</sup> y de estelacianina, Co(II)St<sup>192,245</sup>. En estas proteínas no se ha calculado el tensor de anisotropía magnética, por ello la comparación debe ser más cualitativa. En la Tabla 13 se muestran los valores de desplazamiento químico observados para los protones de los residuos coordinados al cobalto(II) en cada uno de los derivados metalados.

**Tabla 13.** Desplazamientos observados de los protones pertenecientes a los residuos coordinados al cobalto(II) en los derivados de rusticianina, azurina, amicianina, pseudoazurina y estelacianina.

<i>Residuo</i>	<i>Protón</i>	<b>Co(II)Rc<sup>a</sup> Co(II)Az<sup>b</sup> Co(II)Am<sup>c</sup> Co(II)PsAz<sup>d</sup> Co(II)St<sup>f</sup></b>				
		<i>d<sup>obs</sup></i> (ppm)	<i>d<sup>bs</sup></i> (ppm)	<i>d<sup>bs</sup></i> (ppm)	<i>d<sup>bs</sup></i> (ppm)	<i>d<sup>bs</sup></i> (ppm)
HisN	HN	5.7	-9.1	-	-	-
	Hβ1	-15.78	16.0	-	-	-
	Hβ1	-	20.3	-	-	-
	Hε1	-	97.0	37.8/117.9	57.4/145.8	115
	Hδ2	59.7	50.6	52.6	53.1	45.3
	Hε2	69.2	74.9	62.3	61.9	74.4
Cys	Hβ1	287	232	285	315	206
	Hβ2	260	285	285	267	180
HisC	HN	8.95	14.6	-	-	-
	Hα	-	5.5	-	-	-
	Hε1	-	75.0	37.8/117.9	57.4/145.8	86
	Hδ2	48.7	56.4	51.0	43.6	51.4
	Hε2	80.3	65.8	74.0	71.4	63.4
Met	HN	0.97	1.7	-	-	-
	Hα	-1.58	-3.2	-	-	-
	Hβ1	-31.0	-18.9	-18.6	-31.2	-
	Hβ2	-24.4	-18.5	-16.1	-	-
	Hγ1	122.9	45.3	132.5	105.8	-
	Hγ2	285.2	-19.1	10.0	271.3	-
	CH <sub>3</sub> ε	103.3	-7.3	74.5	90.2	-
Gln	Hα	-	-	-	-	-1.0
	Hβ1	-	-	-	-	-18.6
	Hγ1	-	-	-	-	66.2
	Hγ2	-	-	-	-	-5.8

<sup>a</sup> Rusticianina (293 K, pH 6.0), presente trabajo. <sup>b</sup> Azurina (310 K, pH 4.5)<sup>230</sup>. <sup>c</sup> Amicianina (313 K, pH 8.0)<sup>197</sup>.  
<sup>d</sup> Pseudoazurina (313 K, pH 8.0)<sup>246</sup>. <sup>f</sup> Estelacianina (313 K, pH 4.0)<sup>192,245</sup>.

En el caso de Co(II)PsAz los protones de la metionina axial tienen un desplazamiento químico muy similar a aquellos que observamos para Co(II)Rc en el presente trabajo; la diferencia de desplazamiento químico para los protones análogos de los residuos coordinados es menor del 10% de sus valores de desplazamiento químico. Ello se debe a la orientación similar así como a la fuerza semejante de la interacción metal-metionina para estas dos proteínas<sup>246</sup>. Esta interacción parecida observada por RMN es consistente con el hecho de que las distancias metal-SδMet son prácticamente análogas en ambas proteínas (Tabla 4).

Por el contrario, Co(II)Am<sup>197</sup> (como Co(II)Az), con una disposición claramente diferente de la metionina axial (Figura 8), muestra unos desplazamientos químicos para los protones de esta metionina completamente diferentes a los que presentan Co(II)Rc o Co(II)PsAz<sup>246</sup>. Este hecho indica que el modo de interacción entre la metionina y el ion metálico es decisivo en la magnitud de la densidad electrónica presente en la metionina. Este análisis no se puede realizar en Co(II)St<sup>192,245</sup> puesto que el ligando axial de esta BCP es una glutamina (Capítulo 3 de Introducción).

Por otro lado, en todos los espectros de RMN de BCP sustituidas con cobalto(II) que se han realizado, la distribución de los protones asignados indica claramente una orientación similar del tensor de susceptibilidad magnética. Este dato sugiere una estructura electrónica similar para todas ellas independientemente de la interacción con la metionina axial e incluso de que exista otro aminoácido, como en St o el mutante Met148Gln Rc, que se analiza en el Capítulo 3.

## 1.6. Isoleucina140

La RMN aplicada a sistemas paramagnéticos se revela como una técnica muy potente para la resolución de parámetros estructurales de proteínas en disolución. En algunos casos mucho más sensible que la cristalografía de Rayos-X o que la RMN en sistemas diamagnéticos. Un ejemplo paradigmático de esta afirmación lo proporciona la Ile140 en Co(II)Rc. En la Figura 41 se observa que los desplazamientos dipolares de algunos de los protones de dicho residuo no se ajustan a los valores calculados aplicando la ecuación 7 y utilizando cualquiera de las estructuras tridimensionales disponibles (en estado sólido y en disolución) de la rusticianina<sup>330,370</sup>. De hecho, mientras para los protones HN, H $\alpha$ , H $\gamma$ 12 y CH $_3$  $\gamma$ 2 de Ile140 se obtiene un ajuste aceptable, los valores observados para el metilo CH $_3$  $\delta$  y el protón H $\gamma$ 11 del mismo residuo se desvían ampliamente de los calculados. De acuerdo con la orientación del tensor obtenido y con las estructuras tridimensionales de Rc, la señal correspondiente al metilo CH $_3$  $\delta$  de Ile140 (señal *u*) debería aparecer desplazada a campo mucho más alto (-51 ppm) del valor experimental (-11.2 ppm, Tabla 9). Por otro lado, el protón H $\gamma$ 11 de la Ile140 debería aparecer desplazado a campo más bajo (-17 ppm) del desplazamiento observado (-31 ppm). Así mismo, los valores de  $T_1$  de estos dos protones son también diferentes de

los esperados a partir de las distancias al ion metálico. Si comparamos los tiempos de relajación longitudinal de los protones cuyas señales están resueltas, el protón H $\gamma$ 11 de la Ile140 debería tener valores de  $T_1$  más altos (mayor de 5 ms, no los 3.2 ms observados, Tabla 9). Por el contrario, el metilo CH $_3\delta$ , a 4.1 Å del ion metálico, debería mostrar un valor de  $T_1$  mucho más corto (menor de 5 ms, y no los 13.0 ms experimentales, Tabla 9). Todos estos datos nos llevan a la conclusión de que la cadena lateral de la Ile140, al menos en nuestras condiciones de trabajo, presenta una posición relativa diferente con respecto al ion metálico si la comparamos con la que esa misma isoleucina presenta en las estructuras tridimensionales de la rusticianina hasta ahora resueltas. Concretamente en nuestras condiciones esos protones están más cerca del cobalto(II).

En estas estructuras el ángulo diedro  $\chi_3$  (C $\alpha$ -C $\beta$ -C $\gamma$ -C $\delta$ ) de la Ile140 tiene un valor de  $177 \pm 8^\circ$ . Hemos calculado la contribución de pseudocontacto para los protones del metilo CH $_3\delta$  de esta isoleucina cambiando su ángulo diedro  $\chi_3$  entre  $177^\circ$  y  $\pm 180^\circ$  en pasos de  $10^\circ$  y manteniendo el resto de los ángulos de la cadena inalterados. Si asumimos un valor de  $-130^\circ$  para este ángulo (esto es, una rotación de  $+53^\circ$ ), el valor esperado de desplazamiento dipolar para este metilo sería  $-14.5$  ppm y estaría del ion metálico 5.3 Å. Estos dos valores estarían de acuerdo con nuestros resultados experimentales. Por lo tanto, podemos afirmar que es ésta la orientación que presenta la Ile140 en nuestras condiciones de trabajo. Por otro lado, si examinamos minuciosamente la orientación de las cadenas laterales de la Ile140 para la familia de estructuras en disolución (fichero 1CUR.pdb del PDB<sup>370</sup>), encontramos que dos de ellas (las estructuras 17 y 23) tienen la misma orientación y las mismas distancias protón-ion metálico que las esperadas para nuestro estudio. Esto significa que los datos aquí presentados son consistentes con las restricciones experimentales utilizadas en la determinación de la estructura de Rc en disolución<sup>370</sup>. Por lo tanto, es probable que en disolución tenga lugar algún cambio conformacional que implique el giro de dicho ángulo. Se deduce que la RMN de paramagnéticos es mucho más sensible ubicando cambios conformacionales en el entorno del ion metálico que la RMN de sistemas diamagnéticos. También concluimos que esa es la principal orientación, si no la única, de la cadena lateral de la Ile140, tanto para nuestro derivado de cobalto como para la proteína nativa. Este cambio conformacional de la Ile140 puede ser relevante en el ambiente hidrofóbico que envuelve al metal.

## 1.7. **Potencial Redox**

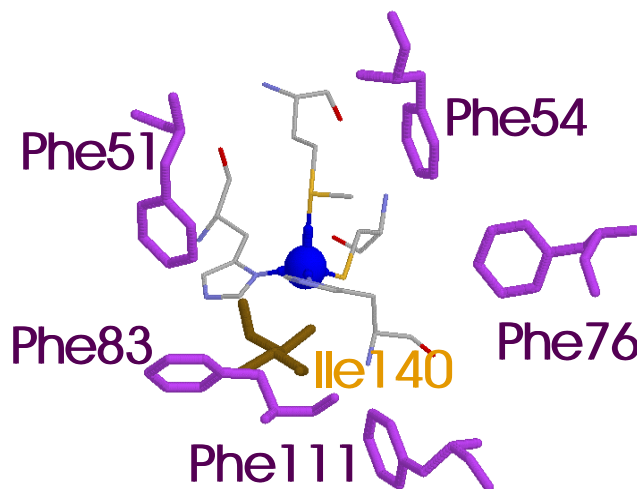
El potencial redox de Rc (680 mV) es, con mucho, el más alto de los potenciales redox de todas las BCPs<sup>247,261</sup> (Capítulo 3 de Introducción). Se han expuesto diferentes características estructurales que contribuyen al potencial redox en BCPs, entre éstas destacan: el grado la alta hidrofobicidad del centro activo<sup>330,370</sup>, la existencia de puentes de hidrógeno en los átomos dadores de los ligandos<sup>368</sup>,

la existencia de dipolos (grupos CO, NH, OH) orientados de forma específica en los alrededores del centro activo<sup>526</sup>, la mayor o menor fuerza de enlace Cu-S $\gamma$ Cys<sup>265</sup> y, relacionada con ésta, la mayor o menor interacción entre el cobre y la metionina axial<sup>491,527,528</sup>.

Esta última hipótesis viene avalada por el hecho de que la sustitución de la metionina axial en la rusticianina por otros aminoácidos con diferente polaridad modifica el potencial redox de la proteína<sup>491</sup>. No obstante, el intervalo de los potenciales redox de estos mutantes a un valor de pH fijo (pH 6.2) es 250 mV (de 363 mV para el mutante Met148Glu Rc, hasta 613 mV para el mutante Met148Leu Rc<sup>491</sup>), mientras que el intervalo de los potenciales redox en las BCP es 500 mV (desde los 185 mV de la estelacianina a los 680 mV de la rusticianina). Por lo tanto, este factor no debe ser decisivo en el alto potencial redox de Rc. La comparación de los espectros de Co(II)Rc con el resto de Co(II)BCPs estudiadas corrobora esto último. Efectivamente los espectros de Co(II)Rc y Co(II)PsAz son muy parecidos, incluyendo los protones de la metionina axial. Esto es indicativo, por un lado, de una misma interacción metal-metionina axial y, por otro, de la misma distribución electrónica del metal. Pese a esta similitud en la estructura electrónica, los potenciales redox de la rusticianina y de la pseudoazurina difieren en más de 400 mV (Tabla 3). Por lo tanto, el distinto grado de intensidad de la interacción ion metálico-metionina axial no es la causa principal del alto potencial redox encontrado en la rusticianina.

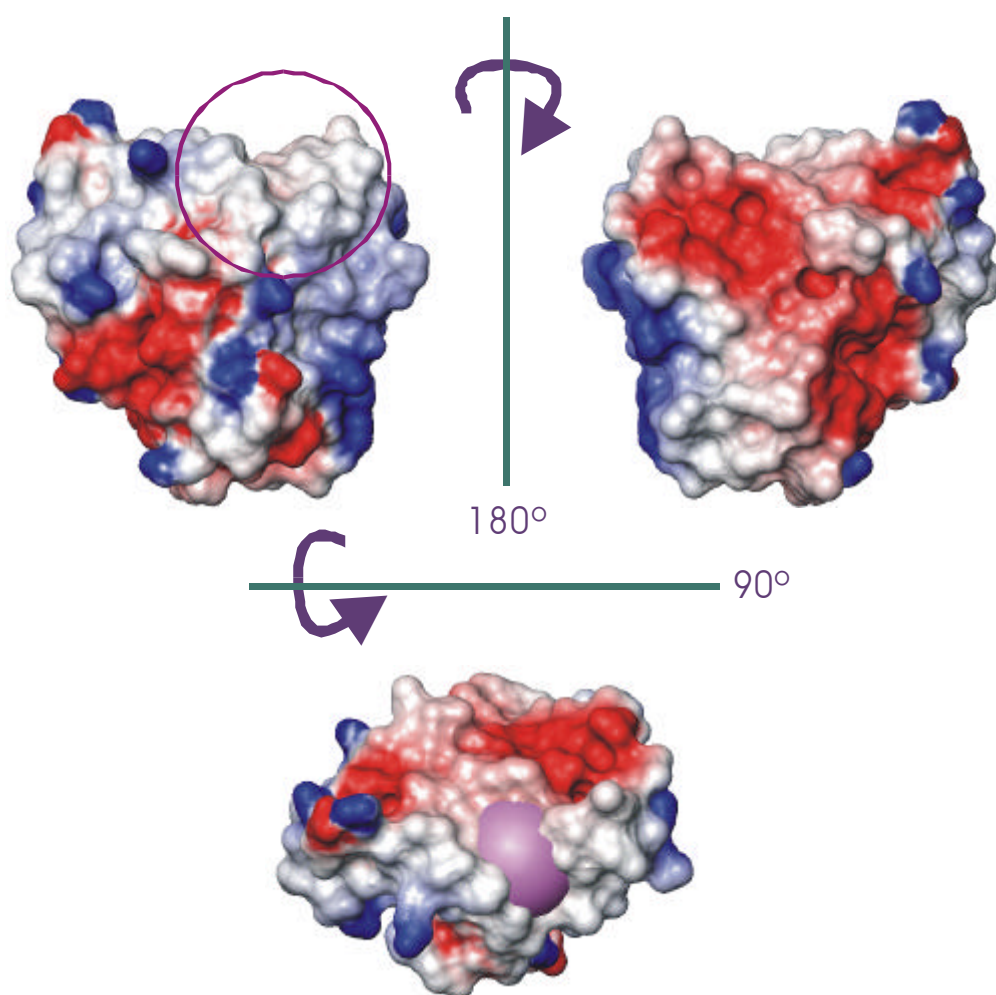
Más aún, nuestros datos demuestran claramente que la interacción de la metionina axial es totalmente diferente en Co(II)Rc y Co(II)PsAz con respecto a Co(II)Az. Sin embargo, en ambos casos, este enlace no altera ni la distribución electrónica ni la orientación de los orbitales con densidad de espín electrónico desapareado del ion cobalto(II). Así pues, de nuestros resultados se desprende que la metionina no regula el potencial redox en Rc.

Por otra parte, la hidrofobicidad del ion metálico y su accesibilidad al disolvente son factores determinantes en el potencial redox de las metaloproteínas. Esto se ha sugerido no sólo para la rusticianina en el caso de las BCPs<sup>330,370</sup>, sino también para otros sistemas que contienen iones metálicos como ferredoxinas y proteínas de hierro de alto potencial (HIPIP)<sup>529,530</sup>. Nuestros datos corroboran esta hipótesis. Como se observa en la Figura 46, existen bastantes residuos hidrofóbicos en los alrededores del ion metálico. La representación de las superficies de potencial electrostático en rusticianina (Figura 47) también muestra, de forma muy gráfica, el carácter hidrofóbico del entorno de coordinación del cobre. El ion metálico se encuentra embebido en una zona que carece de residuos cargados (zona no coloreada). De entre éstos, la Ile140 es un residuo apolar muy cercano al metal e impide el acceso a las moléculas de agua hasta el sitio metálico. Este residuo no está presente en otras BCP. Su interacción con el ion metálico se ha propuesto como un factor crucial responsable del alto potencial redox de la proteína<sup>330,370,491</sup>.



**Figura 46.** Aminoácidos hidrofóbicos en las proximidades del ion metálico en la rusticianina.

A partir de nuestros datos se observa claramente que el efecto de los electrones desapareados en los residuos hidrofóbicos es evidente ya que todos ellos presentan contribuciones dipolares grandes en sus desplazamientos químicos. Análogamente, estos residuos hidrofóbicos tienen una fuerte interacción dipolar con el espín electrónico del cobalto(II) (Figura 46, Tabla 9). Las interacciones dipolares entre el núcleo resonante y el ion metálico (observadas en el presente estudio mediante RMN paramagnético) influyen drásticamente en la estabilidad relativa de los diferentes estados de oxidación del cobre. El ion cúprico, con una carga mayor, está más desestabilizado en este entorno hidrofóbico que el ion cuproso. Estas conclusiones están de acuerdo con estudios realizados, previos<sup>330,370,491</sup> y más recientes<sup>526</sup> al nuestro, en el sentido de que este efecto dipolar es el factor más significativo en la determinación del alto potencial redox de esta proteína. La RMN permite “observar” directamente cómo los protones de los anillos aromáticos sienten el entorno paramagnético. Del mismo modo el ion siente el efecto hidrofóbico de estos residuos.



**Figura 47.** Representación de la superficie de potencial electrostático de Rc (1RCY.pdb<sup>330</sup>). El entorno del cobre (círculo púrpura) es la zona más hidrófoba de la molécula. En la Figura inferior el ion cobre se ha representado deliberadamente como una esfera de radio exagerado (7 Å) para visualizar su posición.

---

## 2. Estudio de la Rusticianina de Cobre(II) a 800 MHz

En este Capítulo presentamos el estudio de la rusticianina en su estado oxidado, cobre(II), mediante RMN de  $^1\text{H}$  a un campo magnético de 18.8 T. En base a la espectroscopía de intercambio, hemos identificado todas las señales del espectro que presentan desplazamiento hiperfino. Entre éstas hemos logrado detectar y asignar las resonancias de los protones  $\text{H}\beta$  de Cys138 y el protón HN amídico de la Ser86, que no se observan directamente por ser excesivamente anchas ( $\Delta\nu_{1/2} > 2.0 \times 10^5$  y  $8 \times 10^3$  Hz Cys138  $\text{H}\beta$  y Ser86 HN, respectivamente). Basándonos en estos resultados y en el análisis comparativo realizado con los de otras BCPs<sup>199,373,374</sup>, hemos podido correlacionar los factores geométricos que determinan el grado de covalencia de la interacción Cu(II)-S $\gamma$ Cys. Así mismo, hemos desglosado el papel que desempeñan el metal, los ligandos y diversos dominios estructurales de las BCPs cercanos al centro activo a la hora de mantener la geometría de coordinación del cobre(II) en estas proteínas.

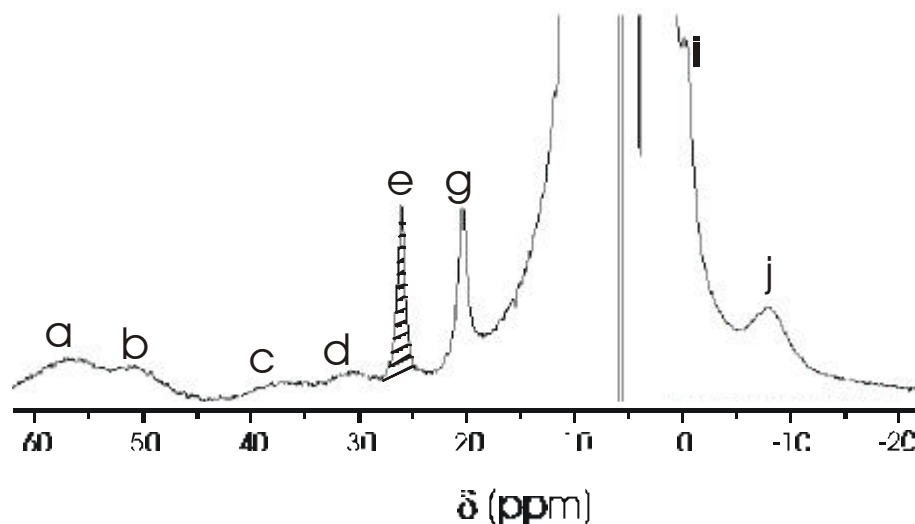
Como se detalla en el Capítulo, la metodología empleada para la caracterización de la estructura electrónica del sistema Cu(II)Rc mediante RMN aplicado a sistemas paramagnéticos es completamente diferente a la utilizada para Co(II)Rc. Ello se debe a las diferentes propiedades respecto a la relajación electrónica de estos dos iones metálicos. No obstante, las conclusiones obtenidas para ambos sistemas son prácticamente análogas.

### 2.1. Espectro de RMN de $^1\text{H}$

En la Figura 48 se muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de Cu(II)Rc en  $\text{H}_2\text{O}$  (5.5 mM, tampón acetato 0.1 M, pH 6.0) obtenido a un campo magnético de 18.8 T (800 MHz para la frecuencia del protón). Este espectro se realizó con la secuencia de pulsos *superwft*<sup>251</sup>. En él aparecen ocho señales con desplazamiento hiperfino, seis desplazadas a campo bajo (señales *a-e* y *g*) y dos a campo alto (señales *i* y *j*). En el espectro realizado en  $\text{D}_2\text{O}$  la señal *e* presenta menor intensidad. Un



análisis más detallado del espectro *superweft* en la zona diamagnética nos permite identificar una señal ancha que relaja rápidamente a 8.1 ppm (señal *m*); la intensidad de esta señal no cambia en el espectro en D<sub>2</sub>O. En la Tabla 14 se especifican los desplazamientos químicos observados y las anchuras de todas estas señales. No se incluyen en esta Tabla los tiempos de relajación longitudinal puesto que al ser éstos muy pequeños, inferiores a 1 ms para todas ellas, el error cometido en su determinación es muy elevado (superior al 50%).



**Figura 48.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de Cu(II)Rc a 18.8 T obtenido mediante la secuencia de pulsos *superweft* en H<sub>2</sub>O (acetato 0.1 M, pH 5.5, 296 K). La señal *e*, cuya intensidad decrece drásticamente en D<sub>2</sub>O, aparece sombreada. Las señales están nombradas por analogía con las del espectro de Cu(II)Pc<sup>199</sup>.

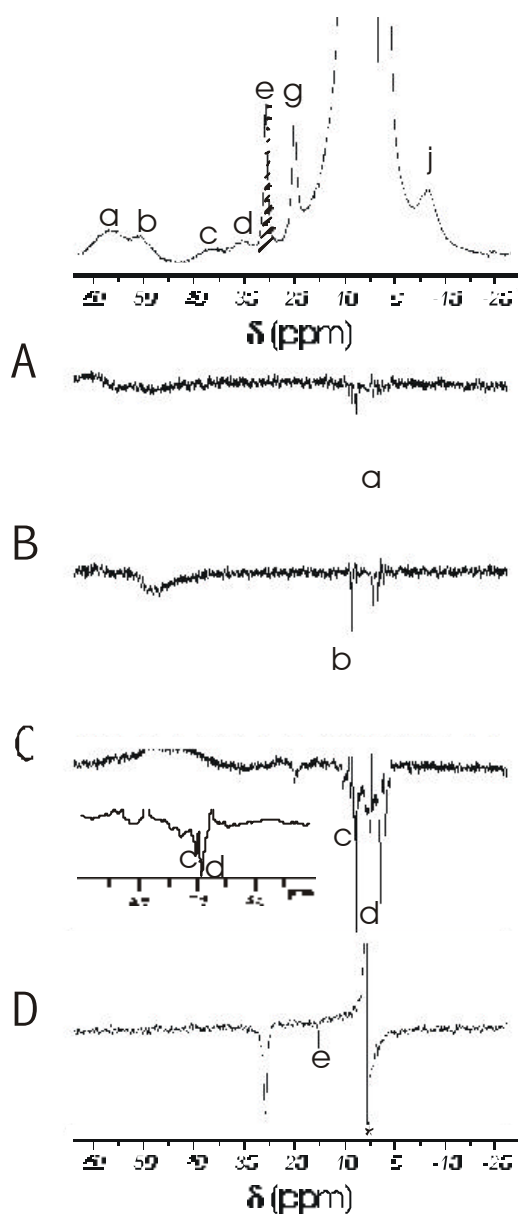
En un sistema de cobre(II) la anisotropía magnética es mínima (Capítulo 2 de Introducción), por lo tanto, todas las señales con desplazamiento hiperfino aquí observadas deben corresponder a protones pertenecientes a los ligandos del metal (para mayor claridad en la discusión de la asignación de estas señales se recomienda tener presente la Figura 36). Los tiempos de relajación de estas señales son tan extremadamente cortos que impiden la observación de acoplamiento dipolares (Capítulo 2 de Introducción). Por ello, hemos realizado su asignación mediante espectroscopía de intercambio (Capítulos 2 de Introducción y 2 de Materiales y Métodos) entre las especies de cobre(II) y cobre(I). Las señales de esta última especie han sido previamente asignadas<sup>512</sup>. En la Tabla 14 se incluyen también los desplazamientos químicos de estas señales en la especie reducida, que nos han servido de base para la asignación. En la Figura 49 se muestran los espectros de transferencia de saturación realizados sobre cada una de las señales de Cu(II)Rc.

**Tabla 14.** Señales de protones con desplazamiento químico hiperfino en Cu(II)rusticianina. Los desplazamientos de los protones en la forma reducida también se muestran. Así mismo, se incluye la anchura de las señales en la forma reducida.

<i>Señal</i>	<i>Asignación</i>	$d^{ox}$ (ppm)	$Dn_{1/2}$ (Hz)	$d^{red}$ (ppm)
	H $\beta$ 1 Cys138	240 $\pm$ 20	2.0 $\times$ 10 <sup>5</sup>	3.2
	H $\beta$ 2 Cys138	300 $\pm$ 50	2.4 $\times$ 10 <sup>5</sup>	2.7
a	H $\delta$ 2 His143	58.1	4700	6.7
b	H $\delta$ 2 His85	50.2	3900	7.9
c	H $\epsilon$ 1 His85	36.7	6000	7.1
d	H $\epsilon$ 1 His143	30.3	4500	7.0
e	H $\epsilon$ 2 His85	25.3	690	14.5
g	H $\alpha$ Ser86	19.5	770	5.0
m	CH <sub>3</sub> $\epsilon$ Met148	8.1		-
i	H $\beta$ 1 His143	-1.6	1300	2.6
j	H $\alpha$ Cys138	-8.9	3100	5.1
	HN Ser86	-20.0 $\pm$ 4.0	8.2 $\times$ 10 <sup>3</sup>	10.6

La irradiación de las señales *a* y *b* dan transferencia de saturación con dos señales a 6.7 y 7.9 ppm, que corresponden a los desplazamientos químicos de los protones H $\delta$ 2 de las histidinas 143 y 85 respectivamente en la especie reducida (Tabla 14). La irradiación de las señales *c* y *d* da transferencia de saturación con dos señales a 7.1 y 7.0 ppm, asignadas a los protones H $\epsilon$ 1 de los ligandos histidinas<sup>512</sup>. Debido a que la diferencia de desplazamiento químico para estas dos señales es mínima en todas las Cu(II)BCPs estudiadas<sup>199,373</sup>, la asignación específica no se había llevado a cabo previamente. Nosotros sí hemos asignado específicamente estas señales mediante la realización de experimentos de saturación entre 20 y 40 ppm irradiando cada 3 ppm. De esta forma obtuvimos unos perfiles de respuesta de la saturación, análogos a los empleados para la detección de las señales de los protones H $\beta$  de cisteína (ver más adelante), que nos permitieron asignar de forma inequívoca las señales *c* y *d*. Así llegamos a la conclusión de que la señal *c* correspondía al protón H $\epsilon$ 1 de His85, mientras que la señal *d* pertenecía al protón H $\epsilon$ 1 de His143. Por otro lado, al irradiar

la señal *e* se observa una respuesta a 14.5 ppm (Figura 49-D), este desplazamiento coincide con el del protón H $\epsilon$ 2 de His85 en la rusticianina reducida.



**Figura 49.** Espectros de transferencia de saturación en Cu(II)Rc realizados al irradiar sobre las señales: A) señal *a*; B) señal *b*; C) señales *c* y *d*; D) señal *e*. En la parte superior se muestra como referencia el espectro RMN de  $^1\text{H}$  de Cu(II)Rc. La señal del agua se indica con un asterisco.

La señal *g* da transferencia de saturación con una señal que aparece a 5.0 ppm correspondiente al protón H $\alpha$  de la Ser86 en Cu(I)Rc (Tabla 14). Cuando irradiamos la señal *i* observamos respuesta a 2.6 ppm. Este desplazamiento corresponde al protón H $\beta$ 1 de His143. La señal *j* la asignamos al protón H $\alpha$  de Cys138 porque da transferencia de saturación con una señal que aparece al desplazamiento químico de este protón en la forma reducida (5.1 ppm).

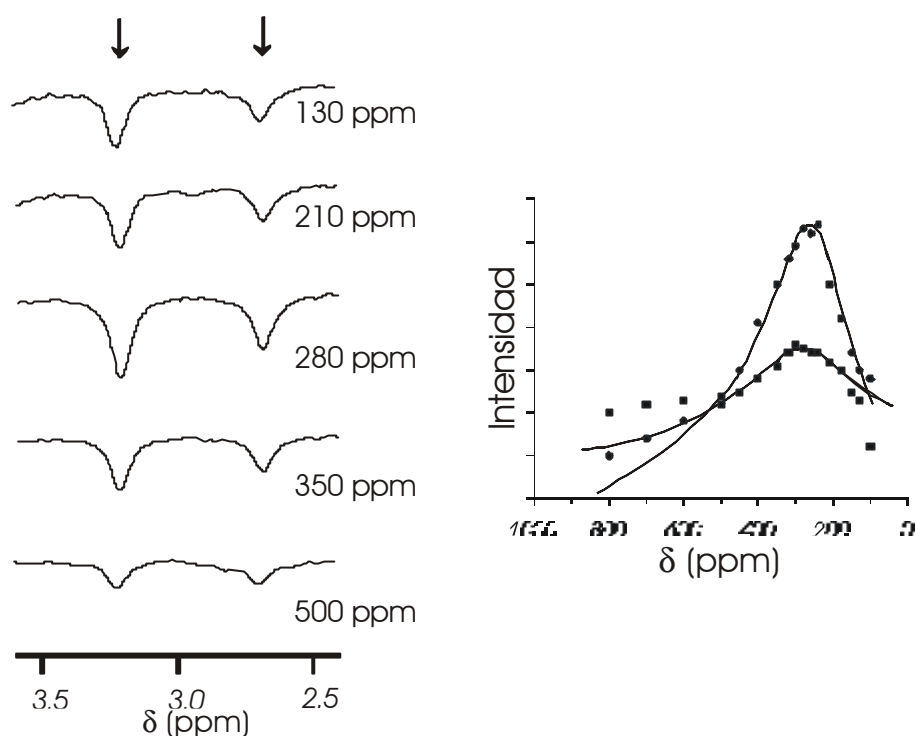
No se pudo irradiar con éxito la señal M por encontrarse sumergida en el entorno diamagnético. Debido a que esta señal no aparece en los espectros *superweft* de los mutantes de Cu(II)Rc en el ligando axial (Capítulo 3), la hemos asignado al metilo CH<sub>3</sub>E de Met148.

Para localizar las señales de los protones H $\beta$  de Cys138 hemos realizado experimentos denominados "NOEs ciegos"<sup>199,373</sup> (apartado 3.4 de Introducción). En la Figura 50 se muestran algunos de estos experimentos. Después de cada irradiación se obtenía NOE a dos desplazamientos químicos, 3.2 y 2.7 ppm, que se corresponden con los protones H $\beta$  de Cys138 en la forma reducida. En la Figura 50 se muestra también la representación de las intensidades de los NOEs obtenidos a estos dos desplazamientos en función del desplazamiento químico al que se irradiaba. Cuando ajustamos estos perfiles a funciones lorentzianas obtenemos dos señales con máximos a  $300 \pm 50$  y  $240 \pm 20$  ppm (Tabla 14). Éstas corresponden a los protones H $\beta$ 2 y H $\beta$ 1, respectivamente, de Cys138. Las anchuras de estas señales son  $2.4 \times 10^5$  y  $2.0 \times 10^5$  Hz.

Realizamos también experimentos NOE ciegos a campo alto. Cuando irradiábamos cerca de -20 ppm, obteníamos respuesta a 10.6 ppm. Este desplazamiento químico corresponde al protón amida HN de la Ser86 en la rusticianina reducida. Observamos esta transferencia de saturación en los experimentos realizados en D<sub>2</sub>O, lo cual nos indica que ese protón no se intercambia fácilmente con el disolvente. Esto ratifica nuestra asignación ya que el protón HN de la Ser86 forma puente de hidrógeno con el átomo S $\gamma$  de la Cys138<sup>330,370</sup>.

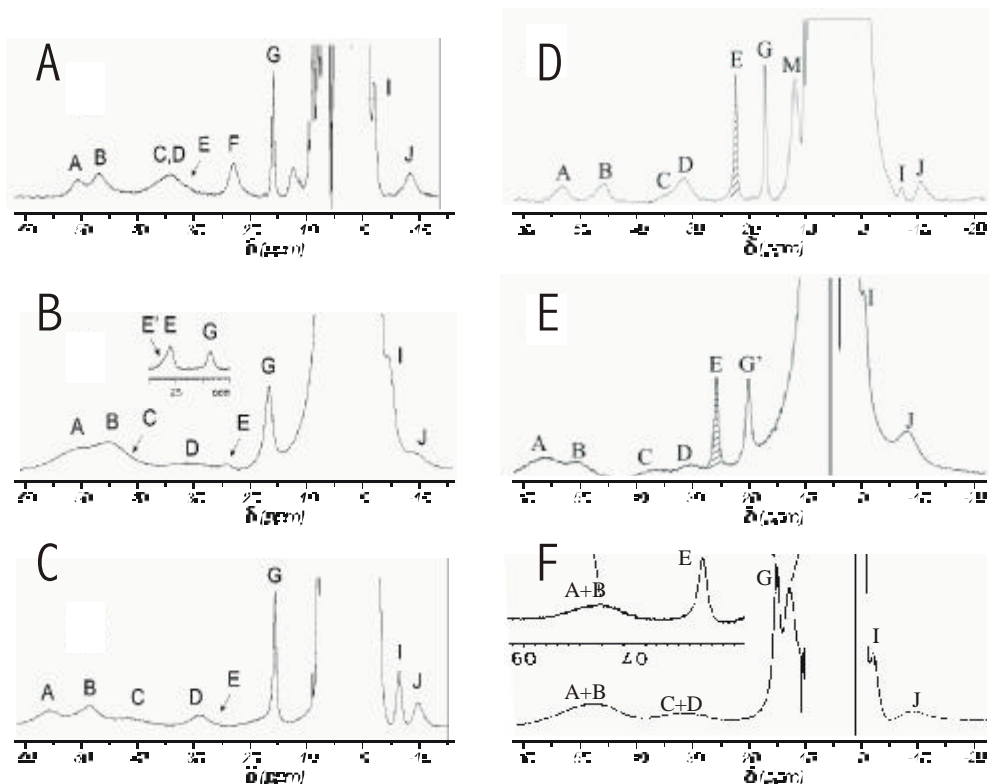
## **2.2. Interacción Metal-Ligando en Cu(II)BCPs**

El espectro de RMN de <sup>1</sup>H de Cu(II)Rc aquí obtenido es bastante similar a los de las demás BCPs oxidadas que se han estudiado (amicianina<sup>198</sup>, plastocianina<sup>199</sup>, azurina<sup>373</sup>, estelacianina<sup>373</sup> y pseudoazurina<sup>374</sup>). En la Figura 51 se representan estos espectros. Basándonos en las semejanzas y diferencias que existen entre ellos, podemos obtener información detallada sobre cómo se distribuye la densidad de espín electrónico desapareado entre los residuos coordinados al metal y sobre cómo éstos influyen en la estructura electrónica del mismo. Para realizar este análisis es necesario conocer las diferentes contribuciones de los desplazamientos hiperfinos (ecuación 5).



**Figura 50.** Espectros de transferencia de saturación en Cu(II)Rc obtenidos al irradiar sobre las frecuencias señaladas en la figura. A la derecha se representan las intensidades de estos NOEs para reconstruir las señales no observables.

La contribución de pseudocontacto,  $\Delta\delta^c$ , la hemos calculado mediante la ecuación 7 según hemos explicado en el capítulo de Materiales y Métodos (apartado 3.4). Los valores de las componentes del tensor  $g$  utilizados fueron<sup>363</sup>:  $g_{xx} = 2.02$ ,  $g_{yy} = 2.06$  y  $g_{zz} = 2.21$ . Hemos asumido que la orientación de este tensor es similar a la descrita para el de la plastocianina<sup>227</sup> y para la azurina<sup>225,226</sup> (en ambos casos el tensor es axial y presenta una orientación muy similar). En la Tabla 15 se muestran los resultados obtenidos. Para estar seguros de que nuestra aproximación es adecuada, hemos calculado cómo variarían estos valores de pseudocontacto en función de otras posibles orientaciones del tensor  $g$ . Los valores obtenidos no difieren, en ningún caso, en más del 50% de los valores de dicha Tabla. Como quiera que el máximo desplazamiento de pseudocontacto es 3.2 ppm (Tabla 15), concluimos que este tipo de desplazamiento es despreciable en Cu(II)Rc. Como está ampliamente descrito (Capítulo 2 de Introducción), en sistemas de Cu(II) la anisotropía magnética es pequeña<sup>106</sup> y, en consecuencia, los valores que figuran en la Tabla son despreciables frente al desplazamiento químico experimental.



**Figura 51.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  a 18.8 T de: A)  $\text{Cu(II)Pc}^{199}$ ; B)  $\text{Cu(II)Az}^{373}$ ; C)  $\text{Cu(II)St}^{373}$ ; D)  $\text{Cu(II)PsAz}^{374}$ ; E)  $\text{Cu(II)Rc}$  (presente trabajo); F)  $\text{Cu(II)Am}^{198}$  (realizado a un campo magnético de 14.1 T).

Una vez determinada la contribución de pseudocontacto, los desplazamientos de contacto se obtienen de forma inmediata (ecuación 5). En la Tabla 15 se muestran los valores de contacto para todas las  $\text{Cu(II)BCPs}$  estudiadas<sup>199,373,374</sup>. Así mismo, una vez conocida la contribución de contacto, se obtienen las constantes de acoplamiento hiperfino ( $A_c/h$ ) a partir de la ecuación 6. Estas constantes de acoplamiento hiperfino se muestran en la Tabla 16. En los próximos apartados analizamos los valores de estos parámetros obtenidos en nuestra proteína y los comparamos con los de las otras  $\text{Cu(II)BCPs}$ .

**Tabla 15.** Desplazamientos químicos experimentales, diamagnéticos, de pseudocontacto y de contacto de los protones pertenecientes a los ligandos del cobre en Cu(II)Rc. También se muestran las contribuciones de contacto de Cu(II)Am<sup>198</sup>, Cu(II)Pc<sup>199</sup>, Cu(II)Az<sup>373</sup>, Cu(II)St<sup>373</sup> y Cu(II)PsAz<sup>374</sup>, así como la media del desplazamiento químico observado de los H $\beta$  de Cys,  $\delta_{1/2}$ . Se incluyen los desplazamientos de contacto de la Ser86 (o su aminoácido equivalente en las demás BCPs, ver texto).

		<b>Cu(II)Rc</b>				<b>Cu(II)Am</b>	<b>Cu(II)Pc</b>	<b>Cu(II)Az</b>	<b>Cu(II)St</b>	<b>Cu(II)PsAz</b>
		296 K, pH 5.5				308K, pH 7.0	298K, pH 7.5	278K, pH8.0	301K, pH6.0	298 K, pH 8.0
<i>Protón</i>		<i>d<sup>exp</sup></i>	<i>d<sup>dia</sup></i>	<i>d<sup>pc</sup></i>	<i>d<sup>con</sup></i>	<i>d<sup>con</sup></i>	<i>d<sup>con</sup></i>	<i>d<sup>con</sup></i>	<i>d<sup>con</sup></i>	<i>d<sup>con</sup></i>
Cys	H $\beta$ 1	240	3.2	0.8	236	-	650	850	450	508
	H $\beta$ 2	300	2.7	0.8	297	-	490	800	370	386
	$\delta_{1/2}$	270				-	570	825	410	450
	H $\alpha$	-8.9	5.1	-0.7	-13.3	-12.9 <sup>b</sup>	-12.3	-11.5	-11.4	a
HisN	H $\delta$ 2	50.2	7.9	-0.8	43.1	36.6	40.5	44.5	42.2 <sup>d</sup>	40.0
	H $\epsilon$ 1	36.7	7.1	-3.5	33.1	-	31.9	44.4 <sup>d</sup>	39.0 <sup>d</sup>	27.6
	H $\epsilon$ 2	25.3	14.5	-0.9	11.7	14.9	20.7	16.7	17.0	13.3
HisC	H $\delta$ 2	58.1	6.7	-0.9	52.3	43.5	45.5	48.2	49.0 <sup>d</sup>	47.3
	H $\epsilon$ 1	30.3	7.0	1.6	21.7	-	28.2	30.6 <sup>d</sup>	27.8 <sup>d</sup>	23.5
Met	CH <sub>3</sub> $\epsilon$	8.1	0.8	1.3	6.0	a	a	a	a	10.5
	H $\gamma$ 1	a				6.7 <sup>c</sup>	8.6			a
	H $\gamma$ 2	a				7.3 <sup>c</sup>	19.9			a
Ser/Asn	HN	-20.0	10.6	-1.7	-28.9		-28.4	-39.0	-22.0	-23.4
	H $\alpha$	19.5	5.0	-0.4	14.9	9.4 <sup>b</sup>	13.1	15.5	13.0	12.7

<sup>a</sup> Señal no observada. <sup>b</sup> Calculado en este trabajo a partir de los datos de la referencia 198. <sup>c</sup> Las asignaciones se pueden intercambiar. <sup>d</sup> La asignación específica de estas señales en Az y St la proponemos en esta Tesis a partir de la comparación con equivalentes señales en Rc.

**Tabla 16.** Constantes de acoplamiento hiperfino en BCPs. Las referencias son las mismas que en la Tabla 15.

Protón	$A_c/h$ (MHz)					
	Cu(II)Rc	Cu(II)Am	Cu(II)Pc	Cu(II)Az	Cu(II)St	Cu(II)PsAz
Cys138 H $\beta$ 1	11		23	28/27	16/13	18
H $\beta$ 2	8		17	27/28	13/16	14
H $\alpha$	-0.47	-0.46 <sup>a</sup>	-0.44	-0.38	-0.41	
HisN H $\delta$ 2	1.55	1.31	1.45	1.49	1.53	1.43
H $\epsilon$ 1	1.19		1.14	1.48	1.40	0.99
H $\epsilon$ 2	0.42		0.74	0.56	0.62	0.48
HisC H $\delta$ 2	1.87	1.56	1.63	1.61	1.77	1.69
H $\epsilon$ 1	0.77		1.01	1.02	1.01	0.85
Met CH <sub>3</sub> $\epsilon$	0.22					0.37
Ser/AsnHN	-1.06		-1.02	-1.3	-0.8	-0.78
H $\alpha$	0.54	0.34 <sup>a</sup>	0.47	0.52	0.47	0.45

<sup>a</sup> Calculado en este trabajo a partir del  $\delta^{\text{exp}}$ .

### a) Ligandos histidina

La comparación de las señales de RMN que presentan los protones del anillo de imidazol de las histidinas en las diferentes BCPs nos permite establecer el siguiente orden, que se mantiene en todas ellas, para su desplazamiento de contacto (los términos HisN e HisC se han definido en la Introducción): HisC H $\delta$ 2 > HisN H $\delta$ 2 > HisN H $\epsilon$ 1 > HisC H $\epsilon$ 1 > HisN H $\epsilon$ 2 (Tabla 15). Así mismo, los desplazamientos de contacto de los tres protones observables de las histidinas, en todas las BCPs, siguen la tendencia H $\delta$ 2 > H $\epsilon$ 1 > H $\epsilon$ 2. Esta tendencia se cumple para los dos ligandos histidina. Basándonos en esto, proponemos una asignación secuencial específica para las señales de histidina en azurina<sup>373</sup> y estelacianina<sup>373</sup> indicadas en la Tabla 15. En el caso de Cu(II)Az, esta distribución de densidad electrónica sobre las histidinas también se encuentra avalada por los datos obtenidos de las técnicas ENDOR (*Electron Nuclear Double Resonance*) y ESEEM (*Electron Spin Echo Envelope Modulation*)<sup>225,531-533</sup>. Por otro lado, los valores de desplazamiento de contacto ( $d^{\text{om}}$ ) para



cada tipo de protón (excepto las señales de H $\epsilon$ 1 de la azurina) aparecen en intervalos de desplazamiento químico bastante estrechos tanto en el caso de HisC como en el caso de HisN.

Todas estas observaciones nos permiten afirmar en primer lugar que la densidad de espín desapareado en ambos ligandos histidina es prácticamente constante, tanto en los centros clásicos como en los distorsionados (Capítulo 3 de Introducción) de las BCPs. En segundo lugar se confirma también que opera el mismo patrón de deslocalización de espín en ambos ligandos histidina. Las dos conclusiones anteriores nos llevan a ratificar que la orientación de los orbitales del cobre en el plano  $xy$  con respecto a los ligandos histidina es muy parecida en todas las BCPs. Groenen y su grupo señalaron que el eje magnético  $z$  en la azurina y varios mutantes (Met121His, Met121Gln) es prácticamente perpendicular al plano definido por el ion cobre y los átomos His N $\delta$ 1 coordinados al mismo<sup>226</sup>. Nuestros resultados corroboran dicha hipótesis.

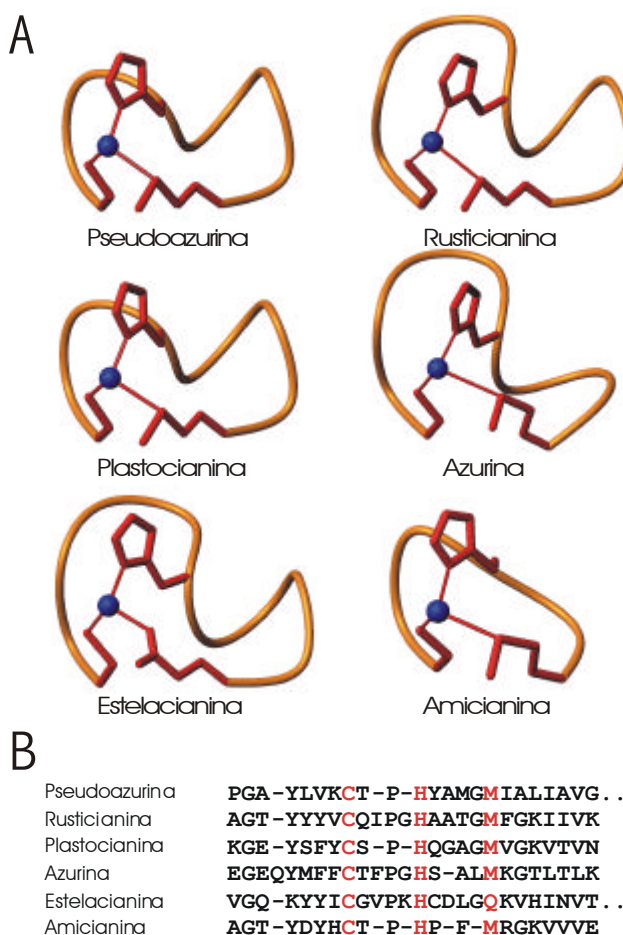
La HisN posee un entorno químico diferente de la HisC en cada BCP. Efectivamente, todas las histidinas C están expuestas al disolvente y ubicadas en el medio de un giro que presenta diferentes longitudes y conformaciones en cada BCP. En la Figura 52 se muestra este giro del entorno de coordinación del cobre en diferentes BCPs. En todas estas proteínas, por el contrario, las histidinas N se encuentran ocultas al disolvente y en la misma posición respecto a elementos estructurales comunes de las BCPs. La pequeña variación de desplazamientos químicos que se observa para los protones imidazólicos de ambos ligandos histidina en todas las BCPs, sugiere que las orientaciones de estas dos histidinas se conservan en todas las proteínas estudiadas. Esto era lo esperado para las HisN pero no para las HisC. Sin embargo, la similitud de las señales de RMN nos llevan a suponer una interacción similar cobre-N $\delta$ 1, es decir, la HisC es suficientemente flexible para acomodar su conformación con respecto al cobre en todas las BCPs. Así, podemos afirmar que la interacción cobre-histidinas es similar en toda la familia: la interacción cobre-HisN está gobernada por los elementos estructurales terciarios alrededor de esta histidina, mientras que la HisC amolda su posición a la del cobre.

### *b) Ligando cisteína*

Las diferencias más significativas que presentan los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de las Cu(II)BCPs son los desplazamientos químicos de los protones H $\beta$  del ligando cisteína que aparecen desde 240 a 850 ppm (Tabla 15). La rusticianina oxidada presenta los desplazamientos químicos más bajos para los Cys H $\beta$  de toda la familia de BCPs.

El desplazamiento químico de los protones H $\beta$  del ligando cisteína está dominado por la contribución de contacto que se encuentra, a su vez, directamente relacionada con la densidad de espín desapareado que reside en el átomo S $\gamma$  del ligando cisteína. Esta deslocalización electrónica de los protones H $\beta$  depende del ángulo diedro Cu-S $\gamma$ -C $\beta$ -H $\beta$ ; (Capítulo 1). En Cu(II)Pc, proteína en la que se ha realizado la asignación estereoespecífica de ambos protones, se propuso una

dependencia del desplazamiento químico de estas señales con el seno cuadrado de dicho ángulo<sup>199</sup>. Esta dependencia sinuoidal se asocia a una deslocalización  $\pi$  dominante<sup>457</sup>. La orientación de los ejes magnéticos  $xy$  en Cu(II)Pc da lugar a un solapamiento de tipo- $\pi$  entre el orbital  $d_{x^2-y^2}$  del cobre(II) y los orbitales del átomo de azufre, de modo que se justifica el tipo de deslocalización<sup>348</sup>. Sin embargo, la distorsión tetragonal presente en Rc origina la rotación del orbital  $d_{x^2-y^2}$ . Por lo tanto, es de esperar que ambos tipos de mecanismos de deslocalización  $\pi$  y  $\sigma$  sean operativos en Rc y, en consecuencia, la dependencia angular es difícil de interpretar de forma precisa.



**Figura 52.** A) Representación esquemática del giro C-terminal que contiene los ligandos Cys, HisC y Met (Gln en caso de estelacianina) para las BCPs indicadas. B) Secuencia de aminoácidos para el mismo giro en las mismas proteínas. Los ligandos del cobre aparecen en rojo. Las estructuras de las proteínas (archivos pdb) son los mismos que los de la Tabla 4.

Por el contrario, los desplazamientos químicos medios de los protones H $\beta$  de Cys ( $\delta^{1/2}$ ) son prácticamente independientes de la conformación de la cisteína (Capítulo 1), de modo que pueden ser utilizados para estimar la densidad de espín electrónico desapareado que reside en el átomo S $\gamma$  de Cys. Los valores de  $\delta^{1/2}$  de H $\beta$  de las cisteínas (Tabla 15) siguen el siguiente orden: Cu(II)Az (825 ppm) > Cu(II)Pc (570 ppm) > Cu(II)PsAz (450 ppm) > Cu(II)St (415 ppm) > Cu(II)Rc (270 ppm). Esto indica que la densidad de espín electrónico existente en el átomo S $\gamma$ Cys138 en la rusticianina ha decrecido en un 55 % con respecto a la plastocianina. Una disminución en la densidad de espín implica (Capítulo 1) una reducción en la covalencia de la interacción Cu(II)–S $\gamma$ Cys. En consecuencia, la RMN de paramagnéticos es una herramienta que cuantifica el grado relativo de covalencia de esta interacción esencial en las propiedades espectroscópicas de las BCPs. La relación entre la covalencia de este enlace y la arquitectura del centro activo se discute más adelante.

### c) *Ligando axial*

En el espectro de Cu(II)Rc no se observa ninguna señal que pueda pertenecer al ligando metionina fuera del entorno diamagnético. Sin embargo, los espectros que realizamos optimizando la detección de las señales que relajan rápidamente, nos permitieron identificar una señal muy intensa a 8.1 ppm que asignamos al metilo CH $_3\epsilon$  de Met148 (Tabla 14). La contribución de pseudocontacto estimada para estos protones es de 0.8 ppm (Tabla 15), lo cual significa que sobre este grupo metilo existe densidad de espín desapareado. En el espectro de Cu(II)Pc (Figura 51) nos encontramos una situación análoga a Rc, es decir, no se observa la señal correspondiente a este grupo metilo. Sin embargo, en el caso de Cu(II)PsAz el CH $_3\epsilon$  de Met86 aparece desplazado a campo más bajo, fuera del entorno diamagnético (12.1 ppm). Estos datos pueden explicarse teniendo en cuenta la distancia Cu–S $\delta$ Met en las BCPs<sup>302,305,330-333</sup>. En la Tabla 17 se dan estas distancias. Cabe destacar que el mayor desplazamiento de contacto del metilo se produce en PsAz, la BCP cuya distancia Cu–S $\delta$ Met es menor (Tablas 15 y 17).

En los espectros de Cu(II)Pc y Cu(II)Am se identificaron las señales correspondientes a los protones H $\gamma$  del ligando metionina (Tabla 15). Sin embargo, estas señales no están presentes en los espectros *superweft* de Cu(II)Rc y Cu(II)PsAz. Podemos justificar estas diferencias por la distinta conformación que adopta la cadena lateral de la metionina en los sitios clásicos y en los distorsionados tetragonalmente. Estas conformaciones diversas dan lugar a patrones de deslocalización electrónica distintos. Por lo tanto, a pesar de que los datos obtenidos por RMN para este residuo son limitados, nos proporcionan información suficiente para justificar la conformación de la cadena lateral de la metionina.

**Tabla 17.** Parámetros estructurales de los centros metálicos de varias BCPs. Los datos han sido obtenidos a partir de los mismos ficheros y referencias que en la Tabla 4.

<i>Proteína</i>	<i>distancia del cobre (Å) a:</i>				Cu-plano (Å)	$\phi$ (deg) <sup>a</sup>	$\alpha$ (deg) <sup>b</sup>
	HisN N $\delta$ 1	HisC N $\delta$ 1	Cys S $\gamma$	L axial			
Rc	2.04	1.89	2.26	2.89(S $\delta$ M148)	0.32	77.1	24.2
Am	1.95	2.03		2.91(S $\delta$ M98)	0.30	79.4	22.3
Pc	1.91	2.06	2.07	2.82(S $\delta$ M92)	0.36	81.6	26.2
Az	2.04	1.99	2.14	3.26(S $\delta$ M121) 2.72(O G45)	0.01	82.3	-0.4
St	1.96	2.04	2.18	2.21(O $\epsilon$ Q99)	0.32	83.5	22.9
PsAz	1.95	1.92	2.13	2.71(S $\delta$ M86)	0.30	79.4	22.3

<sup>a</sup>  $\phi$  es el ángulo formado por los planos CuN<sub>His</sub>N<sub>His</sub> y CuS<sub>Cys</sub>S<sub>Met</sub>. <sup>b</sup>  $\alpha$  es el ángulo formado por el plano CuN<sub>His</sub>N<sub>His</sub> y el vector Cu-S $\gamma$ Cys (ecuación 42).

#### d) *Serina86*

A pesar de que el aminoácido Ser86 no es propiamente un ligando, su inclusión en este apartado está plenamente justificada ya que sus protones sienten desplazamiento hiperfino, es decir, hay coordinación (indirecta, pero covalente) entre este aminoácido y el metal. En efecto, en todas las BCPs el protón amídico del residuo posterior al ligando HisN (His85 en Rc) forma puente de hidrógeno con el átomo S $\gamma$  del ligando cisteína<sup>330</sup>. A través de este enlace de hidrógeno se produce la transferencia de densidad de espín electrónico desapareado<sup>199,230,373</sup>. En la mayoría de las BCPs el residuo que ocupa esta posición es una asparragina, mientras que en la rusticianina se trata de una serina<sup>368</sup>. El protón localizado mediante NOEs ciegos a  $-20.0$  ppm y la señal  $g$  (Tabla 14) presentan un gran desplazamiento hiperfino, debido, esencialmente, a una alta contribución de contacto. Estos protones corresponden al esqueleto de la Ser86, lo que indica que también en Cu(II)Rc existe densidad de espín electrónico desapareado sobre este residuo.

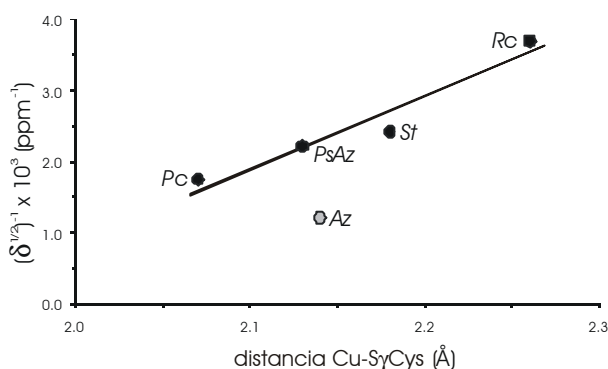
Si exceptuamos la rusticianina, la contribución de contacto, en valor absoluto, para los protones HN de este residuo en todas las BCPs (Tabla 15) sigue la misma tendencia observada para los valores  $\delta^{1/2}$  de los protones Cys H $\beta$ : Cu(II)Az ( $-39$  ppm) > Cu(II)Pc ( $-28.4$  ppm) > Cu(II)PsAz ( $-23.4$  ppm) > Cu(II)St ( $-22$  ppm). Por lo tanto, si el residuo no varía, la densidad de espín desapareado sobre este átomo depende de análogos parámetros que los observados en los protones

H $\beta$  de las cisteínas (ver apartado siguiente). Rc no encaja en la tendencia por poseer un aminoácido diferente en esta posición.

La posición de la señal del protón H $\alpha$  de este mismo aminoácido es mucho menos sensible a la densidad de espín electrónico presente en el residuo cisteína<sup>198,534</sup> y, de hecho, se mantiene prácticamente constante para todas las BCPs (Tabla 15). Esto nos indica que la transferencia directa de espín y la polarización de espín, mecanismos ambos que contribuyen al desplazamiento de contacto (Capítulo 2 de Introducción), son operativos y, en cierta medida, se compensan para todas ellas.

### 2.3. Distribución Electrónica y Geometría del Centro Activo

En la Tabla 17 se muestran algunos parámetros geométricos de las proteínas azules de cobre estudiadas mediante espectroscopía de RMN. Se observa que la proteína con mayor distancia Cu(II)-S $\gamma$ Cys es la rusticianina que, a su vez, es la que presenta el menor valor de  $\delta^{1/2}$  de los protones Cys H $\beta$  (Tabla 15). Es razonable suponer que a mayor longitud del enlace Cu(II)-S $\gamma$ Cys, menor es la densidad de espín electrónico residente sobre el átomo S $\gamma$ . Si éste fuera el único factor geométrico que influyese en la deslocalización electrónica sobre el residuo cisteína, deberíamos observar una regresión lineal cuando representásemos  $1/\delta^{1/2}$  frente a la distancia Cu-S $\gamma$ Cys,  $r_{as}$ . En la Figura 53 se muestra dicha representación.

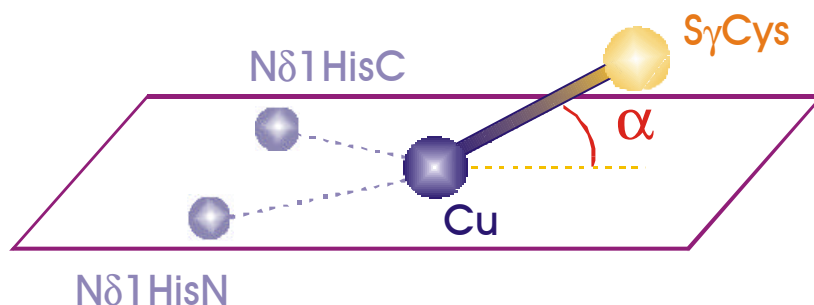


**Figura 53.** Representación de la inversa del valor  $\delta^{1/2}$  para los Cys H $\beta$  (obtenidos de la Tabla 15) en función de la distancia Cu-S $\gamma$ Cys.

La correlación obtenida es aceptable si excluimos la azurina. Efectivamente, teniendo en cuenta el error experimental, las distancias Cu(II)-S $\gamma$ Cys en Cu(II)Az y Cu(II)PsAz son muy similares, pero  $\delta^{1/2}$  en la azurina es prácticamente el doble que en la pseudoazurina. Por lo tanto, esta correlación no

nos sirve para estimar cuantitativamente los desplazamientos de todas las BCPs. Los valores de azurina nos indican que otros factores deben ser también decisivos en el grado de covalencia del enlace Cu-S $\gamma$ Cys.

Todas las descripciones teóricas de la estructura electrónica de los centros metálicos de las BCPs, así como los datos obtenidos mediante diversas técnicas espectroscópicas, indican que el electrón desapareado en el estado oxidado está confinado esencialmente en el orbital  $d_{x^2-y^2}$  (la contribución del orbital  $d_{z^2}$  a la función de onda HOMO en centros distorsionados de cobre es menor del 1.5%)<sup>348</sup>. Por ello, a una distancia Cu-S $\gamma$ Cys fija, el solapamiento cobre-azufre debe depender sólo del desplazamiento del átomo S $\gamma$ Cys del plano  $xy$ . En la Figura 10 se muestra la orientación de estos orbitales<sup>265</sup>. Como ya hemos señalado, los ejes magnéticos  $xy$  del cobre vienen definidos por el plano CuN<sub>His</sub>N<sub>His</sub>. Por lo tanto, el mayor solapamiento orbital tendrá lugar cuando el enlace Cu-S $\gamma$ Cys se encuentre en el plano CuN<sub>His</sub>N<sub>His</sub>. Si definimos el ángulo  $\alpha$  como el ángulo formado por el plano CuN<sub>His</sub>N<sub>His</sub> y el vector Cu-S $\gamma$ Cys (Figura 54), el solapamiento será máximo para un valor de  $\alpha=0^\circ$ . Para un valor de  $\alpha$  de  $90^\circ$  no deberíamos esperar deslocalización electrónica directa sobre el átomo S $\gamma$ Cys. En la Tabla 17 se muestran los valores de este ángulo para distintas BCPs.

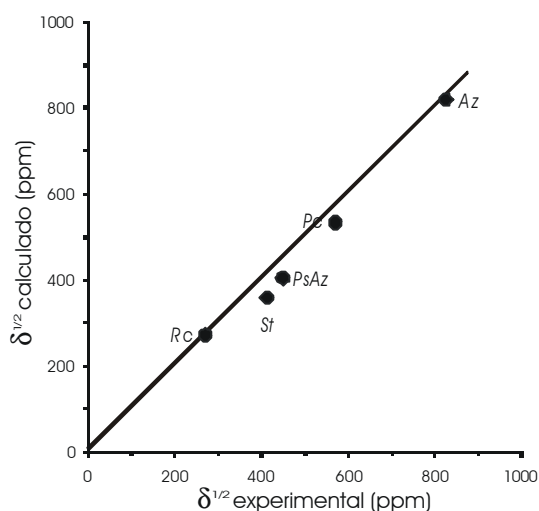


**Figura 54.** Representación esquemática del ángulo  $\alpha$ . Este ángulo es el que forma el vector Cu-S $\gamma$ Cys con el plano CuN<sub>His</sub>N<sub>His</sub>.

Si introducimos este ángulo  $\alpha$  como otro factor geométrico determinante de la interacción Cu-S $\gamma$ Cys, se explica por qué la azurina presenta un desplazamiento químico para los H $\beta$  de Cys112 anormalmente grande de acuerdo con su distancia. El átomo de cobre en esta proteína se encuentra prácticamente en el plano formado por los átomos dadores N<sub>His</sub>N<sub>His</sub>S $\gamma$ Cys. En consecuencia, el valor del ángulo  $\alpha$  para Cu(II)Az es prácticamente cero grados (Tabla 17). Basándonos en estas observaciones, encontramos la siguiente expresión:

$$d^{1/2} = \frac{A}{r + B \tan \alpha + C} \quad [42]$$

donde  $r$  representa la distancia Cu-S $\gamma$ Cys,  $\alpha$  es el ángulo formado por el plano CuN<sub>His</sub>N<sub>His</sub> y el vector Cu-S $\gamma$ Cys (Figura 54) y  $A$ ,  $B$  y  $C$  son parámetros a determinar. Esta ecuación fenomenológica expresa la dependencia inversa del solapamiento Cu-S $\gamma$ Cys no sólo con la distancia de enlace sino también con el ángulo  $\alpha$  tal como lo hemos definido. Podemos determinar el valor de estos parámetros si tenemos en cuenta la situación particular de Az. En efecto, para Cu(II)Az la tangente del ángulo  $\alpha$  es prácticamente cero. Esto elimina la dependencia angular (se anula el segundo sumando del denominador) y nos permite relacionar  $A$  y  $C$ . Ajustando los datos experimentales de la Tabla 17 a la ecuación 42 obtenemos los siguientes valores:  $A = 100 \text{ ppm} \cdot \text{\AA}$ ,  $B = 0.28 \text{ \AA}$ ,  $C = -2.02 \text{ \AA}$ . En la Figura 55 hemos representado los valores de  $\delta^{1/2}$  de los protones Cys H $\beta$  en función de los calculados mediante la ecuación 42. Los valores experimentales están en perfecto acuerdo con los calculados (el coeficiente de regresión lineal obtenido es  $R^2 = 0.93$ ). Esto indica que, a pesar del carácter heurístico de la ecuación,  $\delta^{1/2}$  correlaciona con dos factores estructurales que afectan al solapamiento cobre-azufre: la longitud del enlace Cu-S $\gamma$ Cys y la desviación de este enlace respecto a los ejes del cobre  $xy$ . Esta correlación confirma que el parámetro  $\delta^{1/2}$  proporciona una buena estimación de la densidad de espín electrónico que posee el átomo de azufre S $\gamma$ Cys.



**Figura 55.** Representación de los valores del  $\delta^{1/2}$  de los protones Cys H $\beta$  observados en función de los valores calculados.

El desplazamiento del ion cobre del plano N<sub>His</sub>N<sub>His</sub>S<sub>Cys</sub> se había propuesto inicialmente como un indicador característico del grado de distorsión de los centros de cobre azul<sup>535</sup> (Capítulo 3 de Introducción). Sin embargo, en la plastocianina y en la amicianina, centros tipo 1 clásicos, el cobre se encuentra entre 0.30 y 0.36 Å fuera del plano (Tabla 17). Más tarde, estudios espectroscópicos y teóricos relacionaron el grado de distorsión tetragonal con el ángulo formado por los planos

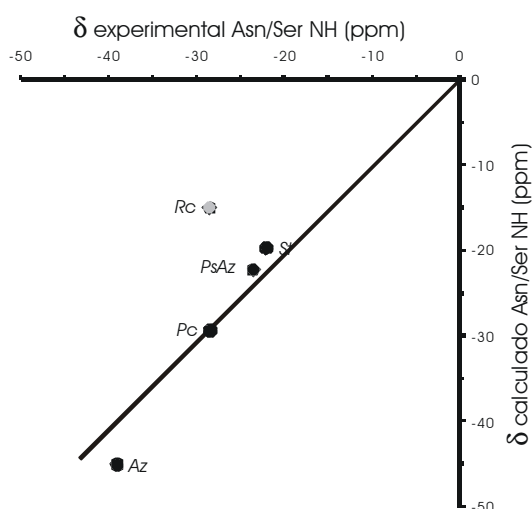
$\text{CuN}_{\text{His}}\text{N}_{\text{His}}$  y  $\text{CuS}_{\text{Cys}}\text{S}_{\text{Met}}$  (ángulo  $\theta$  en la Figura 9)<sup>348,536</sup>. Estos estudios ponen de manifiesto que la relación de intensidades de las dos bandas LMCT a 450 y 600 nm en BCPs, depende de la relación que existe entre el solapamiento Cu(II)-S de tipo  $\pi$  respecto al de tipo  $\sigma$ ; esto es, depende de la orientación que presenta el vector Cu-S $\gamma$ Cys en el plano  $\text{CuN}_{\text{His}}\text{N}_{\text{His}}$ . Ahora bien, nosotros hemos encontrado que la densidad de espín electrónico presente en el átomo S $\gamma$ Cys depende de la orientación del enlace Cu-S $\gamma$ Cys con respecto al mismo plano ( $\alpha$ ). Esto indica claramente que el grado de distorsión tetragonal no está necesariamente relacionado con la fuerza del enlace Cu(II)-S $\gamma$ Cys.

En consecuencia, la RMN de sistemas paramagnéticos permite obtener una visión de la estructura electrónica del ion cobre(II) en BCPs, complementaria a la que se tenía hasta ahora obtenida mediante otras técnicas espectroscópicas. Mediante estas últimas se destacaba la distorsión tetragonal como factor determinante en la estructura electrónica del cobre(II). Mediante RMN nosotros hemos comprobado que la interacción cobre-cisteína, esencial en las propiedades espectroscópicas, cinéticas y termodinámicas de las BCPs, se rige, además, por otro factor adicional: la posición del átomo de azufre respecto al plano CuNN en el que se encuentra el orbital  $d_{z^2-y^2}$  del cobre.

Ya hemos comentado en el apartado anterior que el protón HN de Ser86 (una Asn en las demás BCPs) posee contribución de contacto debido a que forma enlace de hidrógeno con el azufre S $\gamma$  de Cys138. Es de esperar, por tanto, que el mismo tipo de ecuación (ecuación 42) que explica el desplazamiento de los protones H $\beta$  de Cys dé cuenta del desplazamiento de estos protones amídicos en las BCPs. Hemos mantenido los mismos parámetros geométricos,  $B$  y  $C$ , y hemos ajustado el valor de la constante de proporcionalidad  $A$  para obtener el mejor ajuste posible. El valor de  $A(\text{HN})$  obtenido fue de  $-5.0 \text{ ppm} \cdot \text{Å}$ . En la Figura 56 se muestra la correlación encontrada. Si excluimos la rusticianina de esta representación, obtenemos una regresión lineal ( $R^2 = 0.91$ ). El hecho de que esta misma ecuación pueda aplicarse tanto a los protones H $\beta$  de Cys como a los protones HN de Asn corrobora la validez de la correlación propuesta por la ecuación 42. Por lo tanto, para las BCPs que presentan una Asn contigua en la secuencia al ligando HisN, las diferencias que presentan en la deslocalización de espín desapareado sobre el HN de este residuo dependen exclusivamente de la densidad de espín electrónico de Cys S $\gamma$ .

En la rusticianina el protón HN de la Ser86 no sigue esta correlación (Figura 56). De acuerdo con la ecuación 42, este protón presenta una densidad de espín desapareado mayor de la esperada. Por lo tanto, la sustitución de una Asn por una Ser en esta posición altera la distribución de espín electrónico desapareado en la segunda esfera de coordinación del ion cobre.





**Figura 56.** Representación de los valores del desplazamiento químico de contacto de los HN de Asn/Ser observados en función de los valores calculados.

## 2.4. Estructura Electrónica y Estructura Molecular

Este estudio de RMN pone de manifiesto que la estructura electrónica de las BCPs con centros metálicos distorsionados tiene algunas características comunes a la de las BCPs de centros clásicos (Capítulo 3 de Introducción). Respecto a la densidad de espín electrónico del ligando cisteína podemos establecer una tendencia general para todas las BCPs; las proteínas, con centros de cobre azul distorsionados tetragonalmente, como Cu(II)PsAz y Cu(II)Rc, presentan los menores valores de densidad electrónica sobre este residuo. Con todo, nos ha resultado imposible establecer una tendencia general de este tipo para el ligando axial metionina. En efecto, las proteínas con centros clásicos, como Cu(II)Pc, no siguen el mismo patrón de deslocalización para el ligando axial que las que tienen centros distorsionados. Esto se debe a la orientación diferente que presenta la cadena lateral de la metionina en los dos tipos de centros.

Este trabajo pone también de manifiesto pequeñas diferencias existentes entre Cu(II)Rc y Cu(II)PsAz que no se ponen de manifiesto con tanta evidencia utilizando otras espectroscopías. La relación espectral de las bandas LMCT ( $\epsilon_{450}/\epsilon_{600}$ ) es 0.47 en Cu(II)Rc y 0.41 en Cu(II)PsAz y los patrones espectrales EPR son también muy parecidos. Esto concuerda con los valores tan próximos del ángulo  $\theta$  en ambas proteínas (Tabla 17) que predice un grado de distorsión tetragonal parecido. Sin embargo, los datos de RMN revelan ligeras diferencias en las características del enlace Cu(II)-S $\gamma$ Cys en Cu(II)Rc y Cu(II)PsAz. Esto indica que puede haber distorsiones tetragonales similares

inducidas por interacciones metal-ligando diferentes. También se infiere de este hecho que la distorsión geométrica del sitio metálico, y no sólo la interacción del ligando axial con el cobre, puede afectar a la estructura electrónica de los sitios de tipo 1. Finalmente, llegamos a la conclusión de que los factores que gobiernan la densidad de espín electrónico en cada ligando del cobre no son los mismos que dan lugar a la distorsión tetragonal.

Por otro lado, las estructuras cristalinas indican que, a pesar de que la longitud del enlace Cu(II)-S $\delta$ Met en rusticianina es ligeramente mayor que en pseudoazurina o plastocianina (Tabla 17), el enlace Cu(II)-S $\gamma$ Cys es también más largo. Esto nos lleva a afirmar que, en los centros de cobre tipo 1 distorsionados tetragonalmente, la fuerza de los enlaces Cu(II)-S $\gamma$ Cys y Cu(II)-S $\delta$ Met se modula independientemente. Esta observación está en desacuerdo con la tendencia observada para la serie azurina-plastocianina-estelacianina, donde un enlace cobre-ligando axial más corto da lugar a una disminución de la covalencia de la interacción Cu(II)-S $\gamma$ Cys<sup>373</sup>. No obstante, esta correlación se puede justificar tanto en sitios clásicos como perturbados tetragonalmente, ya que en estos centros la perturbación axial lleva al ion cobre fuera del plano ecuatorial sin más distorsiones angulares significativas.

Los ligandos cisteína y metionina en todas las cupredoxinas están ubicados al final de las cadenas- $\beta$ , o, si se prefiere, del lazo que contiene el ligando HisC (Figura 52). Estos residuos presentan una movilidad del esqueleto muy baja, como se ha observado mediante estudios de relajación de los núcleos <sup>15</sup>N en diversas BCPs<sup>534,537,538</sup>. Las hojas- $\beta$  pueden, por lo tanto, fijar la orientación y la distancia de los ligandos cisteína y metionina al cobre. Esta hipótesis está de acuerdo con el estudio de mutagenesis dirigida realizado por el profesor Canters<sup>539</sup> en el que el lazo de la amicianina era sustituido por otros que imitaban los de las diferentes BCPs. Los espectros de resonancia Raman de estos mutantes demostraban que la interacción Cu(II)-S $\gamma$ Cys era la misma para todas las proteínas quiméricas; es decir, la orientación e interacción cisteína-metal, así como la interacción metionina-metal, estaba gobernada por la posición de estos residuos en las cadenas- $\beta$  de la proteína original y no por su posición en los lazos de los mutantes. Además, el mutante de amicianina con el lazo de pseudoazurina presentaba un sitio distorsionado tetragonalmente pero no reproducía las propiedades espectroscópicas de Cu(II)PsAz. Los datos de RMN que presentamos en este trabajo están completamente de acuerdo con este estudio de mutagénesis. Efectivamente, en la Figura 52, se observa que Pc y PsAz poseen una longitud y conformación del lazo similar pero tienen diferentes estructuras electrónicas debido a la distinta orientación de los ligandos cisteína y metionina. Por el contrario, PsAz y Rc poseen una distorsión tetragonal similar a pesar de las diferencias en las conformaciones de sus lazos. Así, podemos concluir que el lazo no condiciona la interacción del metal con estos dos ligandos sino que es el plegamiento completo de la proteína el que modula las interacciones Cu-S $\gamma$ Cys y Cu-S $\delta$ Met.

El ligando HisC está situado en el medio del citado lazo (Figura 52), de tal manera que puede adoptar diferentes conformaciones en el centro metálico. Sin embargo, las constantes de

acoplamiento hiperfino observadas para este aminoácido en las diferentes BCPs, prácticamente invariables, como se observa en la Tabla 16, indican que la orientación de esta histidina está gobernada por la interacción Cu-N $\delta$ 1His.

Por lo tanto, una intrincada red de interacciones, en su mayoría determinadas por la estructura de barril- $\beta$  y no por este lazo, contribuye a determinar la estructura geométrica y electrónica de los sitios distorsionados tetragonalmente. Resumiendo, nuestros datos de RMN nos permiten afirmar que las interacciones de los cuatro ligandos con el cobre están gobernadas por factores diversos: i) en el caso de las interacciones Cu-S $\gamma$ Cys y Cu-S $\delta$ Met es la estructura tridimensional de la proteína la que modula, de forma independiente, el tipo de enlace formado; ii) en el caso de las histidinas, el plegamiento de la proteína no afecta al tipo de interacción Cu-N $\delta$ 1His, las cadenas laterales de estos ligandos se orientan de forma que la interacción con el metal sufre muy pocas variaciones en las distintas BCPs.

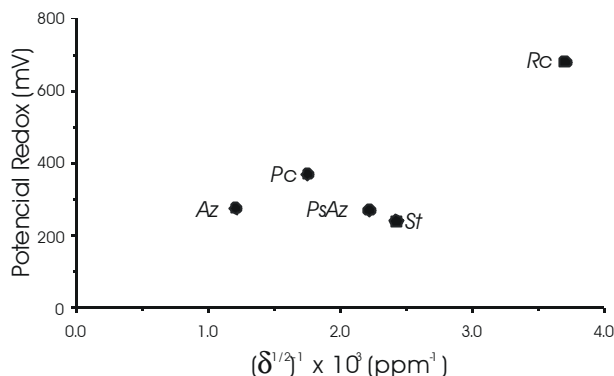
## **2.5. Implicaciones en los Potenciales Redox de las BCPs**

Sola y sus colaboradores han estudiado los factores que gobiernan la termodinámica de los procesos redox en BCPs<sup>355,540,541</sup>. Sus conclusiones proponen que los potenciales redox están determinados principalmente por factores entálpicos, en su mayoría debidos a las interacciones metal-ligando y a efectos electrostáticos que implican al centro metálico. No obstante, las contribuciones entrópicas no se pueden despreciar totalmente. La RMN nos permite evaluar las diferentes interacciones metal-ligando, lo cual nos proporciona directamente información a cerca del término entálpico.

La rusticianina es la BCP con el potencial redox más alto (680 mV)<sup>368</sup>. Este alto potencial ha sido en parte atribuido al ambiente hidrofóbico del centro metálico<sup>330,370,491</sup> y a la sustitución de la asparragina adyacente al ligando HisN por una serina<sup>368</sup>. El hidrógeno peptídico de este residuo forma puente de hidrógeno con el azufre del ligando Cys138. Esta interacción afecta al potencial redox del cobre. La sustitución de la Ser86 por mutagénesis dirigida da lugar a una disminución del potencial redox<sup>368</sup>. La Figura 56 supone una evidencia de que la densidad de espín electrónico presente en el HN de Ser86 es superior al que presentan los correspondientes protones, HN de Asn, de las otras BCPs, lo cual sugiere que el átomo de azufre tendrá menor carácter negativo. Esta característica desestabiliza las especies oxidadas en Rc dando lugar al alto potencial redox.

Una mayor interacción Cu-S $\gamma$ Cys supone una mayor cesión de densidad electrónica del átomo de azufre hacia el metal y, en consecuencia, una mayor estabilización de la forma reducida del cobre<sup>265</sup>. Como se ha comentado, el valor de  $\delta^{1/2}$  de los protones Cys H $\beta$  describe plenamente la fuerza de esta interacción. En la Figura 57 se muestra la representación de los potenciales redox de las BCPs

frente a la inversa de  $\delta^{1/2}$ . Como se observa, la menor interacción se produce para Cu(II)Rc, que es también la que presenta el mayor potencial redox. Concluimos, por lo tanto, que esta interacción Cu-S $\gamma$ Cys no es el factor fundamental que determina el alto potencial redox de Rc.



**Figura 57.** Representación de los valores de los potenciales redox en función de los valores de la inversa del  $\delta^{1/2}$  de los Cys H $\beta$ .

Se ha propuesto también que la interacción Cu(II)-S $\delta$ Met debe contribuir a los potenciales redox de las BCPs<sup>527,528</sup>. Sin embargo, la contribución del enlace Cu-S $\delta$ Met al potencial redox en BCPs es difícil de estimar cuantitativamente. Es interesante destacar que la azurina presenta mayor potencial redox cuando está desnaturalizada que cuando no lo está, a pesar del alto grado de exposición del metal al disolvente. Estudios de RMN han demostrado que el ligando axial metionina está separado del ion metálico en la azurina parcialmente desnaturalizada<sup>385</sup>. Basándonos en estas consideraciones, una interacción Cu-S $\delta$ Met, más débil en rusticianina, podría contribuir a la desestabilización del estado Cu(II), justificando así, parcialmente, su alto potencial redox.

Finalmente, merece la pena hacer un comentario adicional sobre la velocidad de auto-transferencia electrónica,  $k_{ese}$ . Aunque no hemos realizado un estudio de esta constante de velocidad en función de la anchura de las señales observadas en los experimentos de saturación y de la intensidad de los NOEs obtenidos, sí podemos establecer un límite máximo y otro mínimo para esta constante en Rc. La anchura de las señales respuesta en los NOEs, incluidas las de los protones H $\beta$  de Cys138, eran del orden de 50 Hz, es decir, el mismo valor que tienen las señales reducidas. En otras palabras, no se observa un incremento debido al intercambio químico Cu(II)/Cu(I). La anchura de las señales en régimen de intercambio lento, respecto al desplazamiento químico, viene dada por la expresión<sup>108,223</sup>:

$$\Delta T_2^{-1} = K_{ese} [Cu(II)Rc] \quad [43]$$

donde  $\Delta T_2^{-1}$  es el incremento observado en la anchura de la señal debido al canje químico. A partir de esta expresión podemos determinar un límite superior de unos  $7000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para la constante de velocidad de transferencia electrónica (para un valor mayor de  $K_{\text{ese}}$ , la señal comenzaría a observarse más ancha). Así mismo, el valor del NOE en este régimen viene dado por la expresión<sup>108,223</sup>:

$$h = \frac{1}{1 + \frac{R_1^{\text{dia}}}{K_{\text{ese}}}} \quad [44]$$

donde  $R_1^{\text{dia}}$  es el valor de la velocidad de relajación longitudinal del protón en el estado diamagnético (reducido) de Rc. Para un valor inferior a  $500 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  podemos admitir que no se observaría el NOE. Como quiera que el efecto NOE observado en este sistema es muy intenso, es de esperar que el valor de  $K_{\text{ese}}$  esté más próximo al límite superior aquí señalado ( $7000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Este valor es comparable al valor  $16000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  previamente citado en la bibliografía<sup>542</sup>. En efecto, hay que tener en cuenta que, por una parte, en este estudio el valor dado no se corresponde a una medida experimental directa sino que la constante de autotransferencia se dedujo a partir de datos de transferencia electrónica entre Rc y diversos complejos de Fe(III). Por otro lado, el pH de trabajo en ese estudio (2.0) es muy diferente al pH de nuestro trabajo (5.5). Las discrepancias en ambos valores podrían ser suma de estos dos factores.

## **2.6. Diferencias Metodológicas en el Estudio de Cu(II) y Co(II)Rc**

Como ya hemos comentado en la Introducción (Capítulo 2), la principal dificultad a la hora de observar las señales y sus acoplamientos en un sistema paramagnético es el gran incremento en las velocidades de relajación que experimentan dichos núcleos<sup>106-108</sup>; éstas dependen de la interacción entre los espines electrónico y nuclear. En general, cuanto más corto es el tiempo de relajación electrónico, tanto más largos son los tiempos de relajación nuclear. El cobre(II) tiene tiempos de correlación del orden de  $10^{-9}$  s, mientras que los del cobalto(II) son del orden de  $10^{-11}$  a  $10^{-12}$  s. Por lo tanto, los tiempos de relajación nucleares serán mucho más cortos en Cu(II)Rc que en Co(II)Rc.

En estos dos Capítulos hemos estudiado la rusticianina con su metal nativo, cobre(II), y sustituida con cobalto(II). Hemos visto cómo los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos en condiciones paramagnéticas son muy distintos en ambos metaloderivados. Por una parte, el espectro de Co(II)Rc aparece bastante resuelto, las señales son relativamente estrechas y asignables por métodos tradicionales; el tiempo de relajación nuclear en Co(II)Rc es suficientemente largo para que tengan lugar acoplamientos que observamos en la espectroscopía de correlación dipolar (experimentos NOE y NOESY) y escalar (experimentos TOCSY). Por otra parte, el espectro de Cu(II)Rc presenta señales

---

mucho más anchas, algunas no observables directamente (Cys138 H $\beta$  y Ser86 HN), tenemos que recurrir a experimentos diseñados específicamente para su detección (NOEs ciegos) y realizar las medidas a un campo muy alto (18.8 T). En Cu(II)Rc los tiempos de relajación nucleares son tan cortos que no se producen acoplamiento y sólo podemos asignar las señales mediante espectroscopía de intercambio. Resumiendo, la metodología que utilizamos para estudiar Co(II)Rc es básicamente la tradicional (RMN diamagnético) optimizando los parámetros. Por el contrario, para estudiar Cu(II)Rc se ha tenido que desarrollar una metodología específica.

Los complejos de cobalto(II) presentan una alta anisotropía magnética, que proporciona relevante información estructural y electrónica<sup>172,173</sup> no sólo de los residuos ligados al metal, sino también de residuos cercanos al mismo aunque no estén coordinados a éste. Es esta anisotropía la que da lugar a la gran dispersión de señales paramagnéticas en el espectro; estas señales presentan una importante contribución de pseudocontacto en su desplazamiento hiperfino. A partir del desplazamiento de pseudocontacto podemos determinar las componentes del tensor de anisotropía magnética (ecuación 7) y, en consecuencia, obtener información sustancial del centro metálico y sus alrededores. Por otro lado, una vez calculadas las contribuciones de pseudocontacto, podemos también conocer las contribuciones de contacto de las señales pertenecientes a residuos coordinados al metal. Por el contrario, en el espectro de Cu(II)Rc las señales paramagnéticas presentan sólo contribución de contacto y la anisotropía magnética de este metal es prácticamente nula, de modo que sólo podemos obtener información de los ligandos del metal y de la Ser86.

El análisis de las contribuciones de contacto en ambos metaloderivados nos lleva a conclusiones muy similares: i) la interacción M-N $\delta$ 1His es muy parecida en todas las BCPs; ii) las interacciones M-S $\gamma$ Cys y M-S $\delta$ Met dependen de factores estructurales relacionados con el plegamiento global de la proteína y no del metal; iii) los potenciales redox no están modulados únicamente por los ligandos sino que dependen de factores como la hidrofobicidad del entorno metálico y de la Ser86. Estas conclusiones ratifican la validez de la sustitución metálica, que en el caso del cobalto(II) nos proporciona, además, valiosa información a cerca de la segunda esfera de coordinación del metal.

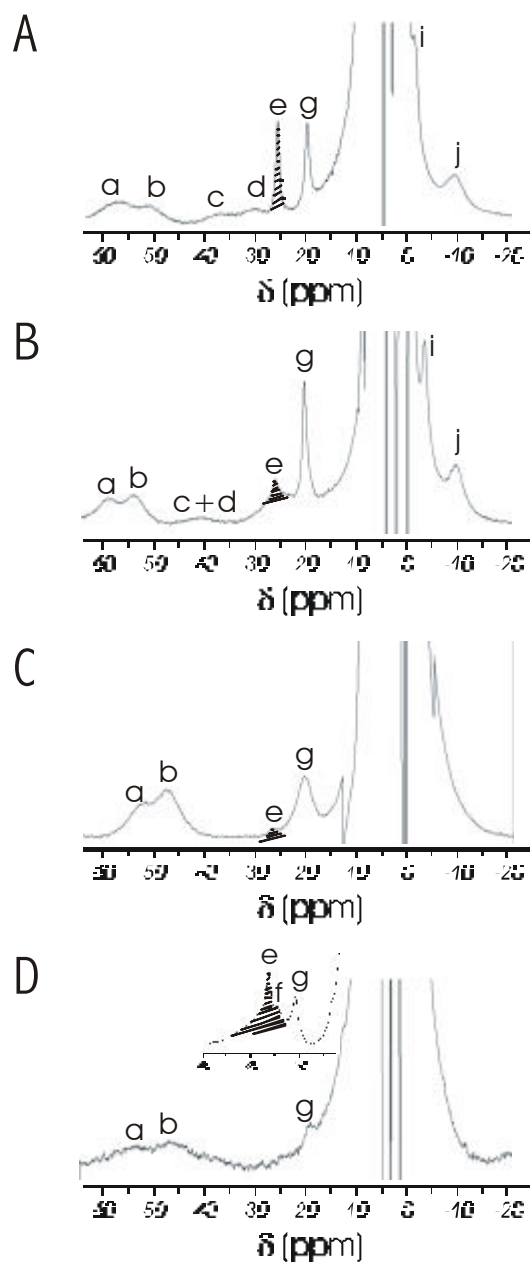
## 3. Mutantes de la Metionina Axial en Rusticianina

En el presente Capítulo hemos estudiado cinco mutantes de la metionina axial (Met148) de rusticianina en estado oxidado Met148Gln Rc, Met148Glu Rc, Met148Cys Rc, Met148Leu Rc y Met148Lys Rc. Así mismo, para el mutante Gln hemos caracterizado también el derivado de cobalto(II). El ligando axial del ion cobre en las BCPs, típicamente una metionina, modula la fuerza de la interacción entre el cobre y el azufre S $\gamma$  del ligando cisteína. Se ha admitido generalmente, aunque nosotros hemos discutido y especificado la validez de esta afirmación (Capítulo 2), que una mayor covalencia en el enlace Cu-S $\delta$ Met llevaría consigo una disminución en la fuerza de enlace Cu-S $\gamma$ Cys. A su vez, esta interacción está directamente implicada en las propiedades espectroscópicas y, presumiblemente, también en las propiedades termodinámicas de las BCPs. En consecuencia, estas dos características estarían indirectamente controladas por el ligando axial metionina. En este capítulo hemos caracterizado estos cinco mutantes en la forma oxidada, Cu(II), mediante RMN de  $^1\text{H}$  a campo alto (18.8 T). Del presente estudio hemos deducido ciertas relaciones entre la estructura electrónica del ion cobre y la naturaleza del ligando axial. Actualmente estamos completando el análisis de los resultados.

### 3.1. Mutantes de Cu(II)Rc

#### a) *Espectros superweft*

En la Figura 58 se muestran los espectros *superweft* a 18.8 T ( $\text{D}_2\text{O}$ , concentración de proteína 5.5 mM, tampón acético 0.1 M, pH 5.5, 296 K) de los siguientes mutantes de rusticianina en estado oxidado: Met148Gln Rc, Met148Glu Rc y Met148Cys Rc. Los espectros de los mutantes Met148Lys Rc y Met148Leu Rc no se incluyen en la Figura porque no presentan señales paramagnéticas observables (más adelante se comenta este hecho).



**Figura 58.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  a 18.8 T, mediante la secuencia de pulsos *superwett* (concentración de proteína 5.5 mM, tampón acetato 0.1 M, pH 5.5, 296 K) de: A)  $\text{Cu(II)Rc}$  en  $\text{H}_2\text{O}$ ; B)  $\text{Cu(II)Met148Gln Rc}$  en  $\text{D}_2\text{O}$ ; C)  $\text{Cu(II)Met148Glu Rc}$  en  $\text{D}_2\text{O}$ ; D)  $\text{Cu(II)Met148Cys Rc}$  en  $\text{D}_2\text{O}$ ; se incluye también el espectro en  $\text{H}_2\text{O}$  donde aparecen las señales intercambiables con el disolvente.



Con el fin de asignar estas señales hemos realizado experimentos de transferencia de saturación en muestras de proteína con la forma oxidada y reducida, estando esta última especie en una proporción inferior al 5 %. No obstante, en dos mutantes, Met148Glu Rc y Met148Lys Rc, estos experimentos no fueron satisfactorios. Las asignaciones se muestran en la Tabla 18.

**Tabla 18.** Señales de protones con desplazamiento químico hiperfino en los mutantes de Cu(II)Rusticianina y en la proteína nativa.

Señal	Asignación	Rc wt	Met148Gln Rc	Met148Glu Rc	Met148Cys Rc
		$d^{ox}$ (ppm)	$d^{ox}$ (ppm)	$d^{ox}$ (ppm)	$d^{ox}$ (ppm)
a	H $\delta$ 2 His143	58.1	55.6	52.2	57.5
b	H $\delta$ 2 His85	50.2	47.7	47.7	52.9
c	H $\epsilon$ 1 His143	36.7	38.8		
d	H $\epsilon$ 1 His85	30.3			
e	H $\epsilon$ 2 His85	25.3	25.7	27.6	26.5
f	H $\epsilon$ 2 His143				24.8
g	H $\alpha$ Ser86	19.5	19.7	20.7	21.1
i	H $\beta$ 1 His143	-1.6	-2.2		
j	H $\alpha$ Cys138	-8.9	-7.9		
z	H $\beta$ 1/H $\beta$ 2 Cys148				-9.0

El mutante Met148Gln Rc presenta ocho señales que aparecen fuera del entorno diamagnético, seis de ellas desplazadas a campo bajo y dos a campo alto (Figura 58-B). Las señales *c* y *d* son las señales más anchas y aparecen solapadas. La señal *e* presenta menor intensidad en el espectro en D<sub>2</sub>O porque corresponde a un protón intercambiable. Este espectro es muy similar al de la proteína nativa (Figura 58-A) así como al del resto de BCPs (Figura 51) estudiadas. Cuando saturamos las señales *a*, *b* y las dos señales solapadas *c* y *d*, observamos transferencia de saturación con señales situadas a 6.7, 7.9, 7.1 y 7.0 ppm respectivamente. Estos NOEs son análogos a los observados para Cu(II)Rc nativa (apartado 2.1 de Resultados) y se corresponden con los protones aromáticos no intercambiables His143H $\delta$ 2, His85H $\delta$ 2, His85H $\epsilon$ 1 e His143H $\epsilon$ 1 respectivamente. La señal *e*, única intercambiable en D<sub>2</sub>O, la asignamos al protón H $\epsilon$ 2 de la histidina

85. No conseguimos observar la señal de transferencia de saturación al irradiar esta señal. Sólo dos protones podrían corresponder a ella, His85H $\epsilon$ 2 e His143H $\epsilon$ 2 (histidina expuesta al disolvente), pero este último se encuentra, como en todas las BCPs<sup>188,198,199,373,374</sup> y también en CuRc nativa (Capítulo 2 de Resultados), en intercambio rápido con moléculas de agua. Las señales *g*, *i* y *j* presentan transferencia de saturación con protones de la especie reducida situados a 5.0, 2.6 y 5.1 ppm, que corresponden a las resonancias de Ser86H $\alpha$ , His143H $\beta$  1 y Cys138H $\alpha$ , respectivamente.

En el espectro de Met148Glu Rc (Figura 58-C) se observan cuatro señales desplazadas fuera del entorno diamagnético. En el espectro en H<sub>2</sub>O, la señal *e* tiene tres veces más área que la señal *g*, lo que nos indica que corresponde a más de un protón. No obtuvimos respuesta al saturar estas señales, por lo que las hemos asignado por homología con el resto de espectros de BCPs<sup>198,199,373,374</sup>.

En el espectro de Met148Cys Rc en H<sub>2</sub>O (Figura 58-D) se observan cinco señales con desplazamiento hiperfino. Dos de ellas desaparecen en D<sub>2</sub>O (señales *e* y *f*). Esta última (señal *f*) tiene un área inferior a la primera, por lo que la asignamos al protón HN $\epsilon$ 2 de His143, histidina parcialmente expuesta al disolvente a este pH. La señal *e* la asignamos por exclusión al protón H $\epsilon$ 2 de His85. La señal *z*, a -9.0 ppm, es exclusiva de este mutante. Cuando irradiamos esta señal observamos una respuesta a 2.90 ppm, desplazamiento típico de un H $\beta$  de cisteína. Esto nos sugiere que este protón podría corresponder a uno de los protones H $\beta$  de la cisteína axial (Cys148).

### b) Velocidades de Relajación Transversal

Atendiendo a la calidad de los espectros que, en definitiva, reflejan la anchura de las señales observadas, es decir, su velocidad de relajación transversal, podemos establecer la siguiente correlación (Figura 58):

$$\text{Met148Gln Rc} \geq \text{Rcwt} > \text{Met148Cys Rc} > \text{Met148Glu Rc} \gg \text{Met148Lys Rc} \square \text{Met148Leu Rc}$$

Aquí, con el signo “mayor que” queremos indicar señales con mayor tiempo de relajación transversal (señales más estrechas). Como se ha indicado en la Introducción (apartado 2.5), la velocidad de relajación de un núcleo observado en un espectro de RMN de <sup>1</sup>H en un sistema paramagnético es inversamente proporcional a la velocidad de relajación electrónica del ion paramagnético a él acoplado. La sustitución de metionina por glutamina conlleva, pues, una relajación electrónica ligeramente más rápida para el cobre. Como quiera que el efecto es mínimo, concluimos que la sustitución de un ligando azufre tioéter de metionina por un oxígeno carbonílico de glutamina no modifica, esencialmente, la geometría de coordinación del cobre. El tiempo de relajación electrónica estimado para St (BCP con una Gln como ligando axial, Figura 8-D) es del orden de 1.6 ns<sup>373</sup>. Las anchuras observadas para el mutante Gln (Tabla 19) son algo menores que

las observadas para St, luego el cobre(II) en este mutante tendría un tiempo de relajación electrónico menor.

**Tabla 19.** Anchura de las señales de protones con desplazamiento químico hiperfino en los mutantes de Cu(II)Rusticianina y en la proteína nativa.

Señal	Asignación		Rc wt	Met148Gln Rc	Met148Glu Rc	Met148Cys Rc
			$Dn_{1/2}$ (Hz)	$Dn_{1/2}$ (Hz)	$Dn_{1/2}$ (Hz)	$Dn_{1/2}$ (Hz)
a	H $\delta$ 2	His143	4700	4000	5000	12000
b	H $\delta$ 2	His85	3900	3500	4000	10000
c	H $\epsilon$ 1	His143	6000			
d	H $\epsilon$ 1	His85	4500	5000		
e	H $\epsilon$ 2	His85	690	660	2000	1700
f	H $\epsilon$ 2	His143				3000
g	H $\alpha$	Ser86	770	780	2500	1500
i	H $\beta$ 1	His143	1300	1600		
j	H $\alpha$	Cys138	3100	3600		

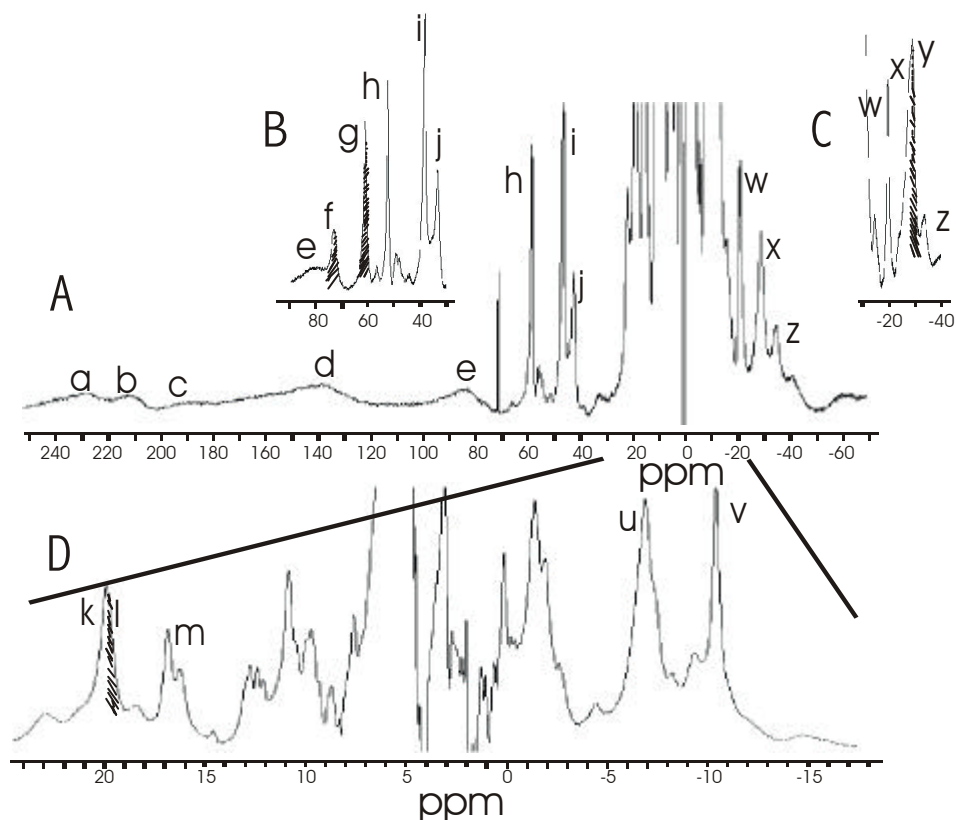
La anchura de las señales en el mutante Met148Cys Rc indica una relajación electrónica del cobre más lenta. Este efecto está más acentuado para el mutante Met148Glu. En ambos casos las anchuras de estas señales son mayores que en Cu(II)Az (para la que se ha estimado un  $\tau_s$  de 0.8 ns<sup>243</sup>). Probablemente, tanto la cisteína como el glutamato imponen una geometría típicamente tetraédrica al cobre(II), lo que conllevaría un alto grado de simetría y una relajación electrónica menos eficiente para este ion.

El caso de los mutantes de lisina y leucina son, probablemente, opuestos a estos dos últimos aunque con un resultado similar e incluso más extremo. En efecto, la larga cadena lateral de la lisina debe provocar la ubicación del cobre en el plano NNS formado por los otros tres átomos dadores. En el mutante Met148Leu Rc, al no existir el cuarto ligando, el cobre, necesariamente, debe situarse en dicho plano. En efecto, la estructura de este mutante, recientemente resuelta mediante rayos X<sup>543</sup>, corrobora esta hipótesis inicial nuestra. En esta posición, la relajación electrónica del cobre es mucho más lenta. De hecho, en Az, el cobre se sitúa prácticamente en este plano<sup>331</sup> (Tabla 4,

Introducción), y es también en esta BCP en la que el ion cobre(II) presenta el mayor tiempo de relajación electrónico. Por lo tanto, en estos dos mutantes es de esperar que el tiempo de correlación electrónico del ion cobre sea inferior a 0.5 ns.

### 3.2. *Co(II)Met148Gln Rc*

En la Figura 59 se muestra el espectro *superweft* del derivado de cobalto(II) del mutante Met148Gln Rc (acetato sódico 0.1 mM, pH 6.3, 296 K).



**Figura 59.** Espectro *superweft* de RMN de  $^1\text{H}$  a 11.7 T del derivado de cobalto(II) del mutante Met148GlnRc (concentración de proteína 2.5 mM, tampón acetato 0.1 M, pH 6.3, 296 K): A) Región completa del espectro comprendida entre 250 y -60 ppm en  $\text{D}_2\text{O}$ . Espectros en  $\text{H}_2\text{O}$  (las señales sombreadas desaparecen en el espectro en  $\text{D}_2\text{O}$ ); B) Región comprendida entre 90 y 30 ppm (se observan los protones His H $\epsilon$ 2); C) Región comprendida entre -10 y -40 ppm (la señal en intercambio con el disolvente es el Gln148 H $\epsilon$ 2); D) Expansión del espectro entre 25 y -20 ppm (zona “pseudo-diamagnética”).

Este espectro es muy similar a otros previamente realizados con otras BCPs que poseen de forma nativa el aminoácido glutamina en posición axial (St<sup>192,245</sup>). Es también muy similar a los mutantes en donde el ligando axial metionina ha sido reemplazado por una glutamina, concretamente en azurina (Met121Gln Az<sup>195</sup>) y en amicianina (Met99Gln Am<sup>349</sup>). Hemos asignado este espectro en base, fundamentalmente, a conectividades dipolares determinadas en los experimentos 1D NOE y NOESY, tal y como se indica en el apartado 1.2 de Resultados. Las asignaciones obtenidas, plenamente coincidentes con las realizadas en otras BCPs análogas<sup>192,195,245,349</sup>, se muestran en la Tabla 20. Las señales equivalentes de CoRc también se incluyen.

**Tabla 20.** Señales de protones con desplazamiento químico hiperfino en los derivados de cobalto(II) de la rusticianina nativa y del mutante Met148Gln.

Residuo	Protón	Co(II)Rcwt		Co(II)Met148Gln Rc	
		Señal	$d^{exp}$ (ppm)	Señal	$d^{exp}$ (ppm)
His85	Hδ2	h	59.7	h	59.0
	Hε1	-	-	d/e	138/82.4
	Hε2	g	69.2	g	66.3
Cys138	HN	-	-	l	19.7
	Hβ1	a	287	a	227
	Hβ2	c	260	b	210
His143	Hδ2	i	48.7	i	47.1
	Hε1	-	-	e/d	82.4/138
	Hε2	f	80.3	f	76.4
Met148	Hβ1	y	-30.96		
	Hβ2	w	-24.39		
	Hγ1	d	122.9		
	Hγ2	b	285.2		
	CH <sub>3</sub> ε	e	103.3		
Gln148	Hβ1				-12.2
	Hβ2			w	-19.6
	Hγ1				-0.64
	Hγ2			j	43.0
	Hε2			y	-29.0

En este espectro cabe resaltar la observación de las señales  $j$ ,  $w$  e  $y$ , esta última intercambiable en  $D_2O$ , correspondientes a la cadena lateral de la glutamina axial. Estos datos nos indican que la coordinación del cobalto en el centro metálico es completamente análoga en todas las BCPs con ligando axial glutamina. Más aún, la estructura electrónica de todos estos derivados es también muy similar. Algunos de los protones del ligando axial poseen contribución de contacto negativa mientras que los ligandos ecuatoriales poseen, todos ellos, contribución de contacto positiva. La posición de las señales de las histidinas es casi idéntica en todos los derivados. Aunque no hemos calculado la orientación del tensor de anisotropía magnética, la existencia de los metilos  $CH_3\delta$  y  $CH_3\gamma$  de Ile140 a campo alto (-10.4 y -6.9 ppm, respectivamente) y de los protones de  $H\epsilon, \zeta$  de Phe51 y  $H\epsilon$  de Phe54 a campo bajo (19.7 y 16.0 ppm) nos indica que la contribución dipolar en este derivado es muy parecida a la existente en CoRc. Todos estos datos conjuntamente confirman que la introducción del ligando glutamina en vez de metionina no modifica la estructura electrónica del ion metálico ni su geometría de coordinación (salvando, obviamente, la naturaleza del átomo dador del ligando axial).

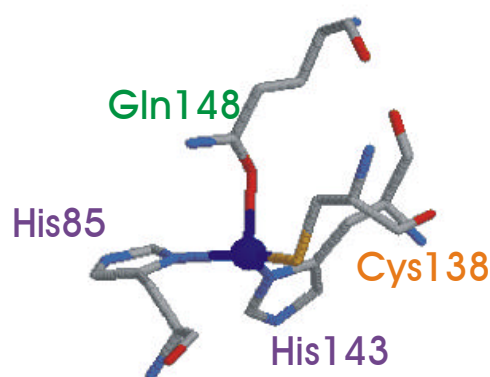
Cabe resaltar la posición de los protones cisteína en este derivado (227 y 209 ppm). El valor medio de estos desplazamientos,  $\delta^{1/2}$ , (218 ppm) es sustancialmente menor que el valor medio de estos protones en Co(II)Rc (268 ppm, Capítulo 1 de Resultados). Este dato indica una unión más débil de la interacción Co- $S\gamma$ Cys en el mutante Met148Gln Rc que en el derivado de la proteína nativa.

### **3.3. Efecto del Ligando Axial**

Los espectros de cobre(II) y cobalto(II) de Met148Gln Rc nos indican que la estructura electrónica y molecular apenas se ve alterada por el cambio de metionina/glutamina. En ambos derivados metálicos las señales correspondientes a los ligandos histidina siguen la misma tendencia que se observa en el resto de BCPs (Capítulos 1 y 2 de Resultados). De modo que, como ya hemos discutido, el patrón de deslocalización de los electrones en las histidinas se conserva a pesar del cambio del ligando axial. La interacción de las histidinas con el cobre no depende de la interacción del metal con los otros ligandos siempre que se conserve la geometría tetraédrica distorsionada.

La estructura de este mutante ha sido determinada mediante difracción de rayos  $X^{544}$ . En la Figura 60 se muestra la estructura del centro activo. Según esta estructura, la distancia Cu- $S\gamma$ Cys es 2.18 Å, es decir, ligeramente más corta que en CuRc (2.26 Å, Tabla 17). Más aún, el cambio de ligando axial implica que el cobre se acerca ligeramente al plano formado por los átomos dadores NNS; en CuRc esta distancia es de 0.32 Å (Tabla 17), mientras que en el mutante Met148Gln Rc es tan sólo 0.22 Å. Nuestros datos corroboran estas mínimas variaciones estructurales puesto que los desplazamientos hiperfinos de ambas proteínas son muy similares (Tabla 17). Como quiera que no hemos tenido éxito respecto a los experimentos de saturación, no nos es posible determinar la posición de los protones

H $\beta$  de cisteína, por lo que no podemos deducir el grado de interacción entre el cobre y el azufre Cys138 Sy. Los resultados con el derivado de cobalto, no obstante, indican que esta interacción es menor (con un valor de  $\delta^{1/2}$  de 218 ppm) que en CoRc (donde  $\delta^{1/2}$  es 268 ppm, Capítulo 1 de Resultados), claramente en desacuerdo con los datos estructurales respecto al ion nativo, Cu(II)Rc. Esta discrepancia podría ser debida a que el cambio del ion cobre(II) por el cobalto(II) produjera una diferente interacción metal-cisteína. No obstante, un cambio así no se corrobora en ninguna de las Co(II)BCPs hasta ahora estudiadas, por lo que parece improbable que suceda. Otra posible explicación podría basarse en las condiciones de obtención de los cristales en el estudio de rayos X. Como se ha comprobado<sup>331</sup>, las BCPs tienden a reducirse en estado cristalino (con más razón Rc, cuyo potencial redox es el más alto). Una mezcla de cobre(I) y cobre(II) produciría cristales indistinguibles aunque modificaría muy ligeramente las distancias interatómicas, fundamentalmente la distancia Cu-SyCys<sup>331</sup>.

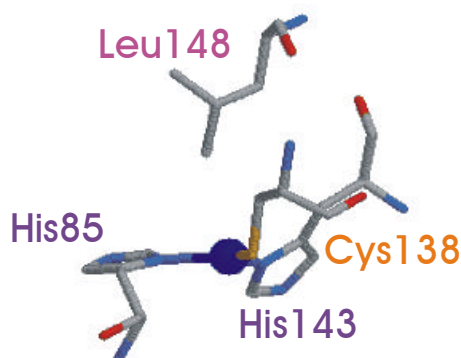


**Figura 60.** Centro activo del mutante Cu(II)Met148Gln Rc (fichero 1E30.pdb<sup>544</sup>).

El potencial redox del mutante Met148Gln Rc es 104 mV<sup>491</sup> inferior al de la proteína nativa<sup>368,491</sup>. En todos los mutantes Met/Gln de BCPs esta sustitución disminuye aproximadamente en esta cantidad (100 mV) el potencial redox del par cobre(II)/cobre(I)<sup>349,491</sup>. Como quiera que ni la estructura electrónica ni la geometría de coordinación del ion metálico se ven modificadas por esta interacción, es de esperar que la disminución en el potencial redox se deba casi exclusivamente al cambio del átomo dador. En definitiva, la interacción del cobre con el oxígeno carbonílico estabiliza en cierta medida la forma oxidada. Como indicamos a lo largo de esta Tesis (Capítulos 1, 2 y 4 de Resultados), la diferencia fundamental de Rc con respecto al potencial redox de otras BCPs radica no tanto en la esfera de coordinación del ion metálico, como en los residuos hidrofóbicos situados en las inmediaciones del mismo.

Los espectros de los mutantes Met148Glu Rc y Met148Cys Rc presentan mayores diferencias con el de Cu(II)Rc que el espectro de Met148Gln Rc. En efecto, además de la anchura de las señales (Tabla 19), los desplazamientos químicos de los protones de las histidinas difieren en mayor medida. Estos dos datos indican que el cobre se sitúa en un entorno más tetraédrico, debido probablemente, en el caso del mutante Met148Cys Rc, a la menor longitud de la cadena lateral cisteína comparada con una metionina. Es posible que, en este caso, el cobre salga aún más del plano formado por los átomos dadores NNS.

En la Figura 61 se presenta el centro activo del mutante Cu(II)Met148Leu Rc, estructura resuelta por rayos X<sup>543</sup>. La geometría y posición del cobre (en el plano NNS formado por los átomos dadores) implicaría una menor relajación electrónica de este ion, con un aumento tal de la anchura de las señales que dejarían de observarse. No obstante, para este mutante la velocidad de transferencia electrónica es óptima y, de hecho, hemos podido observar las señales correspondientes a los protones  $H\beta$  de la Cys138. Los valores obtenidos fueron 260 y 540 ppm. Hemos utilizado la correlación (ecuación 42), aplicada en el Capítulo 2 de esta sección, para predecir, basándonos en propiedades estructurales, el desplazamiento medio hiperfino que deberíamos observar para los  $H\beta$  de Cys138 en este mutante. El resultado obtenido ha sido 470 ppm, aproximado al resultado experimental, 400 ppm. Dada la poca intensidad de las señales de transferencia de saturación, la diferencia puede deberse a errores experimentales o al error intrínseco de los parámetros de la ecuación 42.



**Figura 61.** Centro activo del mutante Cu(II)Met148Leu Rc (archivo 1GY2.pdb<sup>543</sup>).

Finalmente, debemos realizar un comentario adicional sobre la velocidad de transferencia electrónica en estos mutantes en relación con este parámetro en el sistema nativo. En el estado nativo hemos estimado una velocidad de transferencia menor que  $7000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Capítulo 2 de Resultados). En los mutantes Met148Glu Rc y Met148Lys Rc no hemos observado respuesta en los experimentos de saturación. Esto nos indica que la  $k_{\text{ese}}$  debe ser inferior a  $500 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (ecuación 44).



En los mutantes de Met148Gln Rc y Met148Cys Rc sí hemos observado respuesta en la transferencia de saturación aunque la intensidad es claramente inferior que en la proteína nativa. En consecuencia, la  $k_{\text{ese}}$  debe ser inferior a  $7000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (apartado 2.5). Para el mutante Met99Gln Rc de amicianina la velocidad de transferencia electrónica decae un orden de magnitud con respecto a la proteína nativa<sup>349</sup>, mientras que en el caso de la azurina, su mutante Met121Gln Az es 60 veces menos efectivo en la transferencia electrónica<sup>545</sup>. Nuestros datos para el mutante Met148Gln Rc nos aproximarían más a la situación que se produce en amicianina que en la azurina.

Es interesante destacar el caso del mutante Met148Leu Rc, puesto que aquí hemos tenido éxito en los experimentos de saturación y, además, las señales observadas eran claramente más anchas que en el caso de la proteína nativa. A partir de la anchura de las señales de los protones H $\beta$  de cisteína y mediante la ecuación 43 (apartado 2.5), estimamos que la  $k_{\text{ese}}$  para este mutante es del orden de  $20\text{-}30.000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , es decir, este mutante parece ser entre tres y cuatro veces más eficaz a la hora de realizar la transferencia electrónica. Se ha sugerido que la posición del cobre en el plano NNS formado por los átomos dadores minimiza las diferencias estructurales entre ambos estados de oxidación en BCPs<sup>527</sup>. Así, existiría una baja barrera Franck-Condon<sup>356,357</sup> facilitándose la transferencia electrónica. En azurina, cuyo ion cobre se encuentra en el plano NNS, la velocidad de transferencia electrónica es, en efecto, muy alta ( $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )<sup>546</sup>. La reducción drástica al cambiar la metionina axial por glutamina podría estar relacionada con la salida del ion cobre del plano NNS. En el caso del mutante Met148Leu de Rc, la situación del metal en ese plano podría justo tener un efecto contrario (aumentar la  $k_{\text{ese}}$ ).

Actualmente estamos realizando estudios para determinar de forma exacta esta velocidad de transferencia electrónica con más precisión y confirmar nuestros resultados.

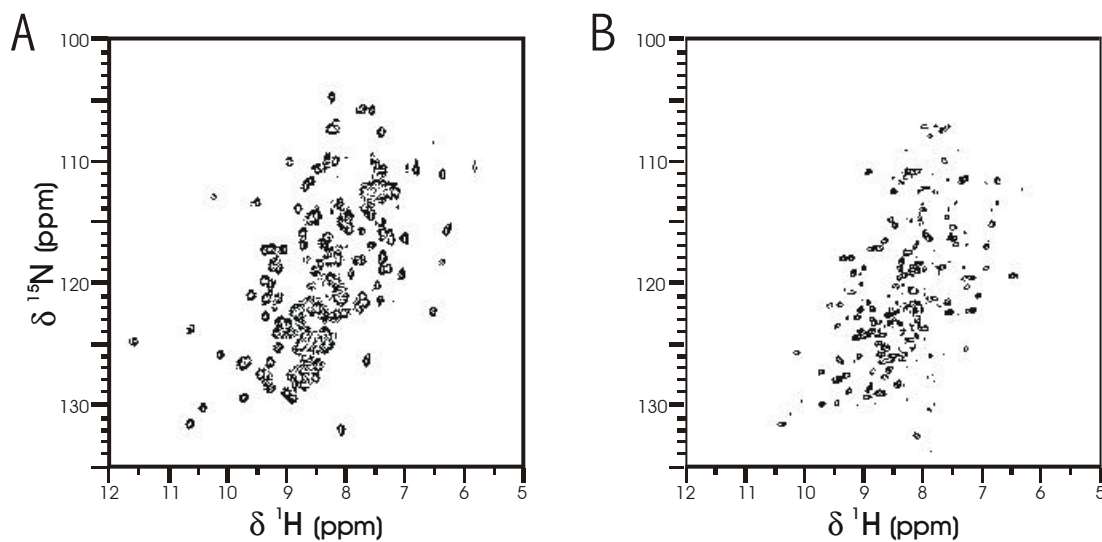
## 4. Dinámica e Hidratación de la Rusticianina.

Hemos estudiado, mediante RMN de nitrógeno-15, las propiedades dinámicas de la rusticianina en sus dos estados de oxidación y a diferentes concentraciones. Así mismo, hemos caracterizado la diferente accesibilidad al disolvente de los grupos N-H peptídicos del esqueleto de la proteína mediante experimentos heteronucleares (*cleanex*, ePHOGSY y de intercambio H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O). Los parámetros de relajación de los núcleos de <sup>15</sup>N de Cu(I)Rc ( $R_1$ ,  $R_2$  y <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N NOE) se han analizado mediante el protocolo *model-free*. También hemos determinado las velocidades de correlación cruzada tanto en el estado reducido, Cu(I), como en el estado oxidado, Cu(II), de Rc. Nuestros estudios nos han permitido caracterizar la movilidad de los distintos dominios de Rc en diferentes escalas de tiempo, así como el grado de hidrofobicidad de esta proteína. Hemos comparado nuestros resultados con estudios análogos previamente realizados con otras BCPs, concretamente con azurina<sup>537</sup>, pseudoazurina<sup>547</sup> y plastocianina<sup>534</sup>. Del análisis comparativo de nuestros datos con los de estos otros sistemas hemos podido relacionar, en buena medida, las propiedades dinámicas de Rc con sus peculiares propiedades termodinámicas (alto potencial redox y estabilidad a bajo pH).

### 4.1. Velocidades de Relajación de <sup>15</sup>N

En la Figura 62 se muestran los espectros <sup>15</sup>N HSQC de la rusticianina reducida y oxidada. La asignación de las señales la realizamos tomando como referencia las publicadas previamente<sup>512</sup>. Los desplazamientos químicos de algunas señales en nuestros espectros HSQC eran distintos, debido a las condiciones diferentes de pH y temperatura en las que se realizaron los experimentos. Para confirmar las asignaciones y resolver ambigüedades, utilizamos los experimentos <sup>15</sup>N HSQC-TOCSY y HNCA (en este último caso, utilizamos la asignación de las señales de carbono-13 ya realizada<sup>548</sup>). Observamos cambios en los desplazamientos químicos de, aproximadamente, un 30 % de las señales. Todas nuestras asignaciones son consistentes con las realizadas anteriormente. De los 140 grupos amida del esqueleto de Rc existentes (Rc posee 155 aminoácidos, de los cuales 14 son

prolinas) hemos logrado asignar 137. Sin embargo, sólo hemos considerado los valores de relajación de 111 núcleos de  $^{15}\text{N}$ . Los 26 restantes los descartamos, bien porque sus intensidades eran demasiado débiles o bien por estar solapados entre sí. Para una mayor claridad en la exposición de los resultados y la discusión que realizamos en el presente Capítulo, en la Tabla 21 se indican y numeran los elementos secundarios existentes en Rc. Así mismo, en dicha Tabla se alinean estos elementos con los de las BCPs cuyas propiedades dinámicas han sido previamente estudiadas: azurina ( $\text{Az}^{537}$ ), pseudoazurina ( $\text{PsAz}^{547}$ ) y plastocianina ( $\text{Pc}^{534}$ ). En las Figuras 7 y 12 de la Introducción (Capítulo 3) se representa la disposición de las hebras- $\beta$  en Pc y Rc, respectivamente. También se recomienda tener presente ambas Figuras.



**Figura 62.** Espectros HSQC ( $\text{H}_2\text{O}$ , acetato sódico 0.1 M, pH 5.5, 296 K) de: A) Cu(I)Rc; B) Cu(II)Rc.

En la Figura 63 representamos los valores de las velocidades de relajación así como de los NOEs  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de estos 111 núcleos de nitrógeno-15. El valor medio de las velocidades de relajación longitudinales ( $R_1$ ) de los núcleos de  $^{15}\text{N}$  del esqueleto es  $1.00 \pm 0.06 \text{ s}^{-1}$ . Seis residuos (Thr2, Leu3, Asp58, Ala70, Lys119, Trp127) presentan valores de  $R_1$  superiores a la media en un valor mayor al doble de la desviación estándar.

El valor medio de la velocidad de relajación transversal ( $R_2$ ) de los núcleos de  $^{15}\text{N}$  es de  $17.4 \pm 1.2 \text{ s}^{-1}$ . Ocho residuos (Thr6, Gly24, Leu46, His57, Asp58, Ala70, Ala107 y Trp127) tienen valores de  $R_2$  significativamente mayores que la media. En la Figura 63-B se observa claramente como los valores de  $R_2$  en la región 57-58 y de los residuos 70 y 107 están muy por encima de la tendencia general del resto de la proteína. Un alto valor de  $R_2$  implica la existencia de fenómenos de intercambio conformacional en escalas de tiempo mayores de nanosegundos<sup>476,502</sup> que contribuyen a la relajación transversal de estos ocho residuos. Otros aminoácidos (Thr2, Leu3, Gly35, Lys36 y

Gly93) tienen valores de  $R_2$  muy inferiores a la media (Figura 63-B). Estos residuos presentan movimientos en la escala de tiempo de nano- o picosegundos.

**Tabla 21.** Alineación de los elementos de estructura secundaria en Rc, Az, PsAz, y Pc. La numeración de los residuos que incluimos en esta Tabla corresponde a cada una de las BCPs indicadas.

<i>Elementos de Estructura Secundaria<sup>a</sup></i>	<i>Número de Residuo en:</i>			
	<b>Rc<sup>b</sup></b>	<b>Az<sup>c</sup></b>	<b>PsAz<sup>d</sup></b>	<b>Pc<sup>e</sup></b>
<i>Hebra-b I<sup>f</sup></i>	8-10	-	-	-
<i>Hélice-a I<sup>f</sup></i>	11-20	-	-	-
<i>Hebra-b II<sup>f</sup></i>	25-27	-	-	-
<i>Hebra-b III<sup>f</sup></i>	30-33	-	-	-
Hebra- $\beta$ IV	36-45	3-10	2-8	1-6
Hebra- $\beta$ V	53-57	14-16	17-19	13-15
<i>Hebra-b VI<sup>f</sup></i>	59-61	-	-	-
Hebra- $\beta$ VII	63-66	18-22	22-25	17-21
Hebra- $\beta$ VIII	71-79	27-36	30-34	26-33
Lazo (80-119)	80-119	37-90	35-63	34-66
	-	<i>Banda-b<sup>h</sup> 46-51</i>	-	<i>40-42</i>
<b>Ligando 1</b>	<b>His85</b>	<b>His46</b>	<b>His40</b>	<b>His37</b>
	-	<i>Hélice-a<sup>h</sup> 55-67</i>	-	-
Giro 93-97 <sup>g</sup>	93-97	74-76	52-56	46-49
Hebra- $\beta$ IX	120-127	91-98	64-67	67-74
	-	<i>Hélice-a<sup>h</sup> 100-102</i>	-	-
Hebra- $\beta$ X	132-138	108-112	72-78	78-84

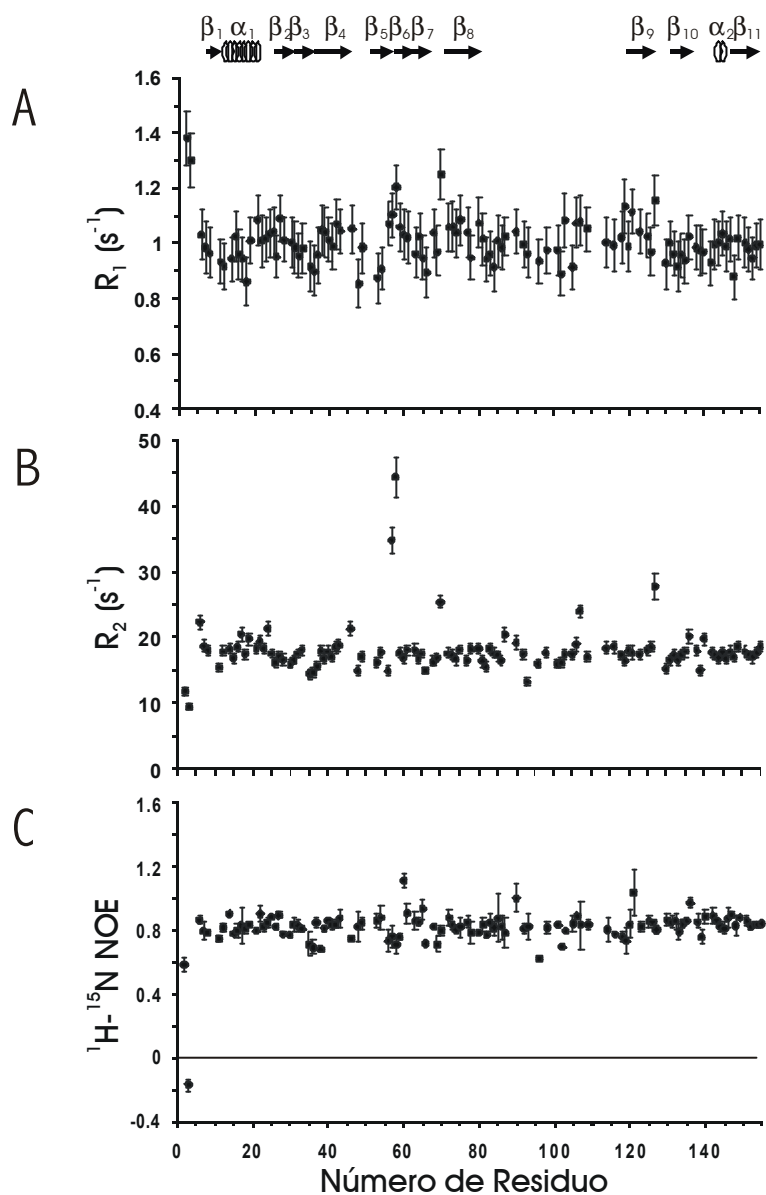
**Tabla 21 (continuación).** Alineación de los elementos de estructura secundaria en Rc, Az, PsAz, y Pc.

Elementos de Estructura Secundaria <sup>a</sup>	Número de Residuo en:			
	Rc <sup>b</sup>	Az <sup>c</sup>	PsAz <sup>d</sup>	Pc <sup>e</sup>
<b>Ligando 2</b>	<b>Cys138</b>	<b>Cys112</b>	<b>Cys78</b>	<b>Cys84</b>
<b>Ligando 3</b>	<b>His143</b>	<b>His117</b>	<b>His81</b>	<b>His87</b>
<i>Hélice-a II</i> <sup>f</sup>	144-146	-	-	-
<b>Ligando 4</b>	<b>Met148</b>	<b>Met121</b>	<b>Met86</b>	<b>Met92</b>
Hebra-β XI	148-155	121-128	86-92	92-99
	-	-	<i>Hélice-a</i> <sup>g</sup> 99-104	-
			<i>Hélice-a</i> <sup>g</sup> 109-122	

<sup>a</sup> La numeración de los elementos de estructura secundaria corresponde a la secuencia de la rusticianina.

<sup>b</sup> Rusticianina de *Thiobacillus ferrooxidans*<sup>330,370</sup>. <sup>c</sup> Azurina de *Pseudomonas aeruginosa*<sup>29</sup>. <sup>d</sup> Pseudoazurina de *Paracoccus pantotrophus*<sup>547</sup>. <sup>e</sup> Plastocianina de *Synechocystis* sp. PCC6803<sup>534</sup>. <sup>f</sup> Elementos únicos de Rc. <sup>g</sup> El giro 93-97 en Rc está alineado con las regiones señaladas en la Tabla para las otras BCPs basándonos en el patrón de movilidad similar que presentan. <sup>h</sup> Elementos presentes sólo en Az. <sup>i</sup> Elementos exclusivos de PsAz.

A partir de la relación  $R_2/R_1$  de los núcleos de  $^{15}\text{N}$  puede discernirse entre los residuos de la proteína con y sin movilidad propia<sup>520</sup>. Para ello, procedemos como se indica en el Capítulo 4 de Materiales y Métodos. De los 111 valores analizados, 14 presentaban una relación  $R_2/R_1$  que excedía en  $2\sigma$  el valor medio encontrado y que, por lo tanto, poseen propiedades dinámicas singulares, diferentes a las de la proteína completa. Eliminados estos datos, la media de la relación  $R_2/R_1$  para los 97 residuos restantes era de  $17.6 \pm 1.2$ . La tendencia de estos valores es paralela a la mostrada por los valores de  $R_2$  (Figura 63-B) debido a que los valores de  $R_1$  son, en general, muy homogéneos (Figura 63-A). En esta Figura destacan los residuos que presentan movilidad en escalas de tiempo de micro- y milisegundos (residuos 57, 58), es decir, regiones que presentan cambio conformacional (ver más adelante).



**Figura 63.** Datos de relajación de Cu(I)Rc (3.0 mM, acetato sódico 0.1 mM, pH 5.5, 296 K): A) velocidades de relajación longitudinales ( $R_1$ ); velocidades de relajación transversal ( $R_2$ ); C) valores de NOE  $^1H-^{15}N$ .

Los valores de NOE  $^1H-^{15}N$  (Figura 63-C) también proporcionan información dinámica en escalas de tiempo rápidas (subnanosegundos). Once residuos (Thr2, Leu3, Gly35, Lys36, Val38, Val56, Asp58, Ile66, Gly69, Tyr96, e Ile102) presentan valores de NOE significativamente inferiores al valor

medio. Cabe destacar el valor negativo del NOE de la Leu3, indicativo de que la región N-terminal de Rc no está estructurada. La media del valor de los NOEs exceptuando estos 11 residuos, es  $0.83 \pm 0.04$ . Este valor coincide, dentro del error, con el valor máximo teórico para el NOE (0.835), esperado para una proteína del peso molecular de Rc que carezca de movimientos internos<sup>476</sup>. Cuatro residuos (Lys60, Glu65, Thr90, Gly121) presentan NOEs que superan el valor medio en más del doble de la desviación estándar. Este fenómeno ha sido observado previamente y se puede deber a la existencia de intercambio entre los protones amida y los del disolvente. Este intercambio puede afectar a la intensidad de las señales del experimento de referencia<sup>504,549</sup>.

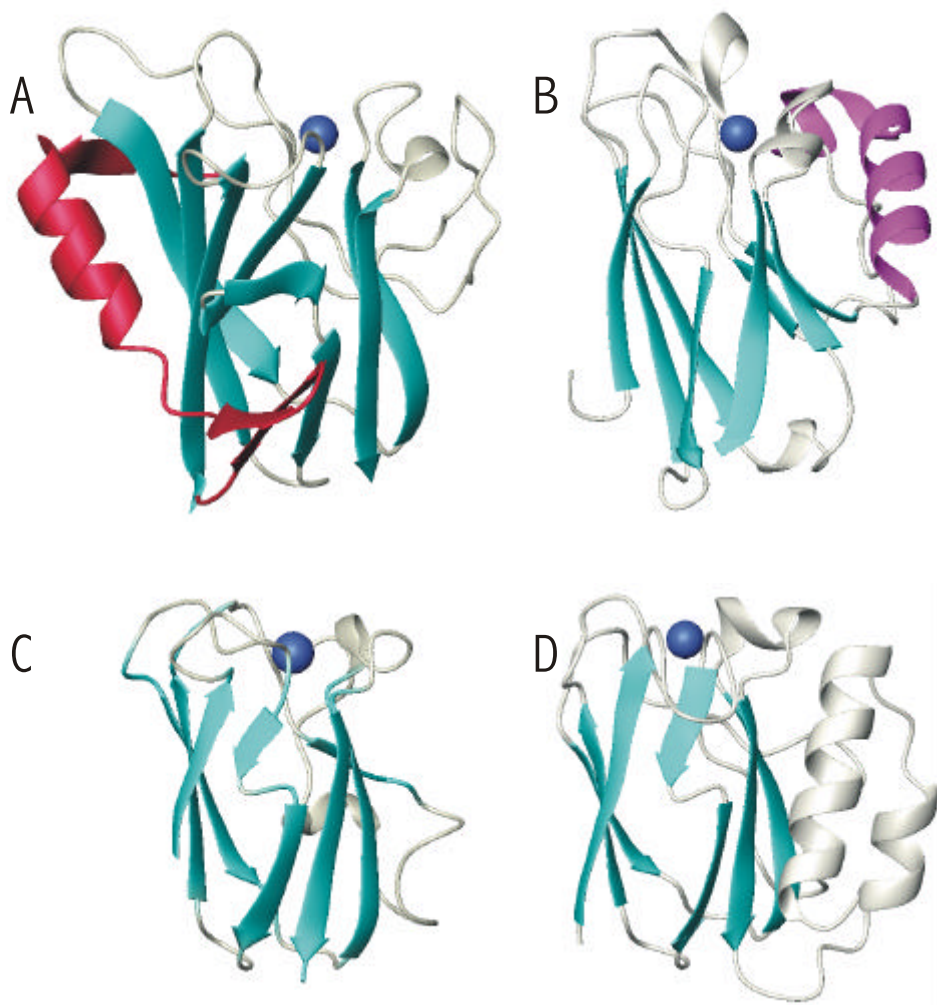
Los datos experimentales, resumidos en la Figura 63, revelan la presencia de movilidad interna en el extremo N-terminal, en la región que comprende los aminoácidos 35-38 y en las regiones correspondientes a los residuos 56-58, 66-70 y 93-96. Para comprender mejor la naturaleza de estos movimientos internos y conocer de forma cuantitativa la escala de tiempo en la que se producen, procedemos al análisis de los datos de relajación mediante el protocolo *model-free* (apartado 3.2 de Fundamentos Teóricos).

## 4.2. Análisis model-free

A partir de la estructura media de Rc en disolución reducida (fichero 1CUR.pdb<sup>370</sup>), y utilizando el programa Quadric Difussion<sup>519</sup> (apartado 4.2 de Materiales y Métodos), calculamos el tensor de inercia de la proteína. Utilizamos este fichero porque es el único de entre todas las estructuras depositadas de Rc con las coordenadas de los primeros cinco aminoácidos; las demás estructuras están resueltas por difracción de Rayos X. Este dato es ya de por sí una indicación de la carencia de estructura de esta región en Rc. Los valores principales normalizados de este tensor resultaron ser 1.00;0.80;0.71. Los tiempos de correlación individuales locales, estimados a partir de los valores de la relación  $R_2/R_1$ , se ajustaban correctamente utilizando el modelo isotrópico. Cuando intentamos ajustarlos a los modelos axial y anisotrópico, obtuvimos valores de 3.08 y 0.6 para el test- $F$ <sup>481,482</sup>, respectivamente, es decir, el incremento en el número de parámetros no mejora significativamente el ajuste. Así pues, realizamos todos los cálculos asumiendo un modelo isotrópico para nuestra proteína. Este modelo isotrópico presume que la proteína completa no tiene movimientos preferentes respecto a ningún sistema de referencia. Los datos de relajación de la azurina se ajustan al mismo modelo de difusión<sup>537</sup>, mientras que para la plastocianina<sup>534</sup> y para la pseudoazurina<sup>547</sup> el modelo elegido fue axialmente anisotrópico. En la Figura 64 se muestran las estructuras tridimensionales de estas cuatro BCPs. Pc y PsAz presentan topologías próximas a la de un cilindro (Figuras 64-C y D). Por el contrario, Rc y Az son más esféricas (Figuras 64-A y B).

A partir del mismo tratamiento de los datos  $R_2/R_1$  también se obtuvo el tiempo de correlación efectivo,  $\tau_r$ , de Rc, resultando ser 13.2 ns. Los valores típicos para una proteína del peso molecular

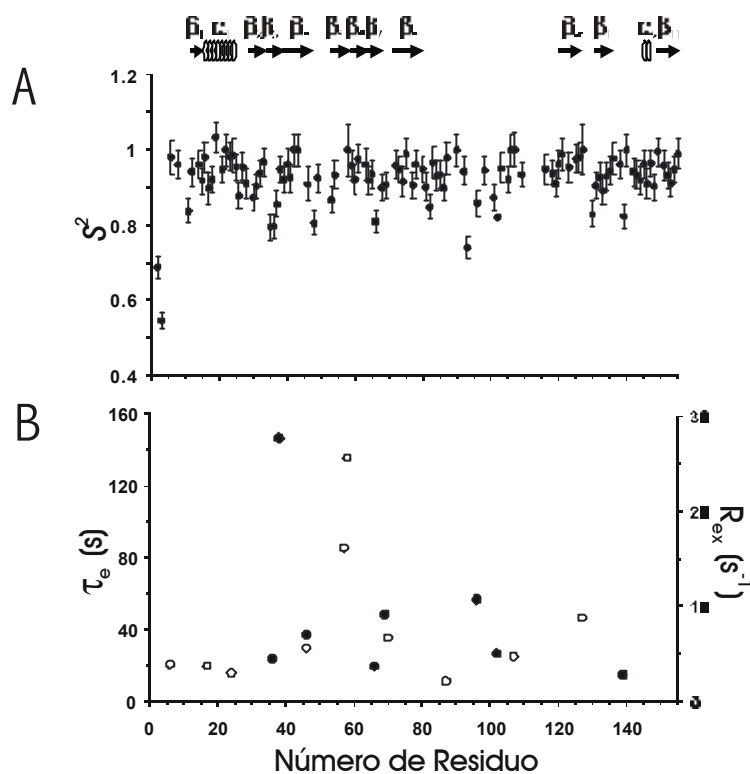
de la rusticianina (16500 Da) en un campo de 14.1 T, oscilan entre 9 y 11 ns<sup>550,551</sup>. Por lo tanto, el valor obtenido por nosotros para el  $\tau_r$  supera el valor esperado entre un 10 y un 20 %. Sin embargo, este valor es bastante inferior al esperado para proteínas de doble peso molecular. Por ejemplo, la forma monomérica de un triple mutante de la superóxido dismutasa humana (de 153 aminoácidos) posee un tiempo de correlación de 9.3 ns, mientras que la forma dimérica del enzima nativo presenta un  $\tau_r$  de 26 ns<sup>551</sup>. Por todo ello, consideramos que Rc es un monómero a la concentración de 3.0 mM.



**Figura 64.** Estructuras tridimensionales de: A) Rc (1RCY.pdb<sup>330</sup>); B) Az(1E5Y.pdb<sup>329</sup>); C) Pc (1PLC.pdb<sup>301</sup>); D) PsAz (1BQK.pdb<sup>332</sup>). En todos los casos el barril- $\beta$  se representa en color celeste. En las estructuras de Rc y Az se destacan los elementos de estructura secundaria que son característicos de estas proteínas y que no están presentes en el resto de BCPs.



Hemos calculado el parámetro de orden,  $S^2$ , para cada residuo mediante el análisis *model-free*<sup>476</sup>. En la Figura 65-A representamos los valores de  $S^2$  para los 111 residuos estudiados. Siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 4 de Materiales y Métodos, hemos obtenido un valor medio para el parámetro de orden de  $0.93 \pm 0.03$ . La tendencia del parámetro de orden (Figura 65-A) refleja los elementos de la estructura secundaria de la proteína: los valores más altos se obtienen para las hélices- $\alpha$  (la media de  $S^2$  para las hélices- $\alpha$  I y II, Tabla 21, es de 0.93) y las hebras- $\beta$  (la media de  $S^2$  para todas ellas es 0.94), mientras que la mayor flexibilidad se observa en los lazos que se encuentran en las regiones norte y sur del barril- $\beta$ .



**Figura 65.** A) Parámetro de orden,  $S^2$ , en función del número de residuo de Cu(I)Rc (mismas condiciones que en la Figura 63); B) Tiempo de correlación,  $\tau_e$ , de los residuos que presentan movimientos internos en la escala de tiempos rápidos (subnanosegundos) residuos que se han ajustado a los modelos 2 ó 4 (círculos negros, eje de ordenadas izquierdo); velocidades de intercambio,  $R_{ex}$ , de residuos que presentan movilidad en la escala de tiempos de micro- a milisegundos, se ajustan a los modelos 3 ó 4 (círculos blancos, eje de ordenadas derecho).

Diez aminoácidos presentan un valor de  $S^2$  inferior al valor medio: Thr2, Leu3, Gly35, Lys36, Gly48, Ile66, Gly93, Ile102, Thr130, Gln139 (Figura 65-A). Los bajos valores del parámetro de orden observados para los residuos 2-3 y 35-36 reflejan que la movilidad de la región N-terminal y de los

residuos 35-38 es mayor a la del resto de la molécula. Los demás residuos están ubicados en los lazos de la proteína. Además, estos residuos se encuentran próximos a aminoácidos prolina, que contribuyen a la movilidad local. Por otra parte, los cuatro residuos coordinados al cobre presentan valores de  $S^2$  que oscilan entre 0.90 y 0.96. Por lo tanto, estos ligandos presentan una baja movilidad dentro de la media del resto de la proteína.

De acuerdo con el protocolo *model-free*, los datos de relajación para cada par N-H pueden ajustarse a uno de los cinco posibles modelos<sup>476</sup> (apartado 3.2 de Fundamentos Teóricos). Noventa y cuatro de los ciento once aminoácidos analizados (84.7 %) se ajustan al modelo 1 del análisis *model-free*. Siete residuos (Lys36, Val38, Ile66, Gly69, Tyr96, Ile102 y Gln139) se ajustaron teniendo en cuenta los movimientos internos rápidos en la escala de tiempo de subnanosegundos (modelo 2). Dos de estos residuos, Lys36 y Val38, están ubicados en la región que presenta mayor movilidad de la proteína (Figura 65-A). Los valores observados para Ile66 y Gly69 ponen de manifiesto que la dinámica de la región donde se encuentran, justo entre las hebras- $\beta$  VII y VIII (Tabla 21), tiene un comportamiento distinto al resto de la proteína. Lo mismo ocurre con la Tyr96, que es, a excepción de los aminoácidos del extremo N-terminal, el residuo con el menor valor del parámetro de orden. La Tyr96 está situada en un giro Gly-Pro-Pro-Tyr que, además, forma parte del lazo de 40 aminoácidos (80-119) que conecta las hebras- $\beta$  VIII y IX (Tabla 21). Los tiempos de correlación observados para estos residuos y que mostramos en la Figura 65-B varían entre 15 y 147 ps.

Nueve residuos (Thr6, Ala17, Gly24, Val56, His57, Asp58, Ala70, Ala107 y Trp127) sólo se pudieron ajustar al introducir una constante de canje ( $R_{ex}$ , ecuación 28, Capítulo 3 de Fundamentos Teóricos) que da cuenta de movimientos en la escala de tiempo de milisegundos (modelo 3). El análisis *model-free* pone de manifiesto la existencia de intercambio conformacional para estos residuos (Figura 65-B). Las velocidades de intercambio se encuentran en el intervalo de 2.2 a 25.7 Hz. La mayoría de estas velocidades están por debajo de los 5.0 Hz que es el umbral propuesto para considerar efectos de intercambio conformacional<sup>488</sup>. Sin embargo, la región donde se encuentran His57 y Asp58, un pequeño lazo situado entre las hebras- $\beta$  V y VI (Tabla 21), está indiscutiblemente por encima de este límite. Los aminoácidos Ala70 y Trp127 también presentan una  $R_{ex}$  claramente superior a 5.0 Hz.

El único residuo por clasificar es Leu46, que se ajustaba al modelo 4, con valores de 37 ps y 5.7 Hz para  $\tau_e$  y  $R_{ex}$  respectivamente.

### **4.3. Velocidades de Correlación Cruzada**

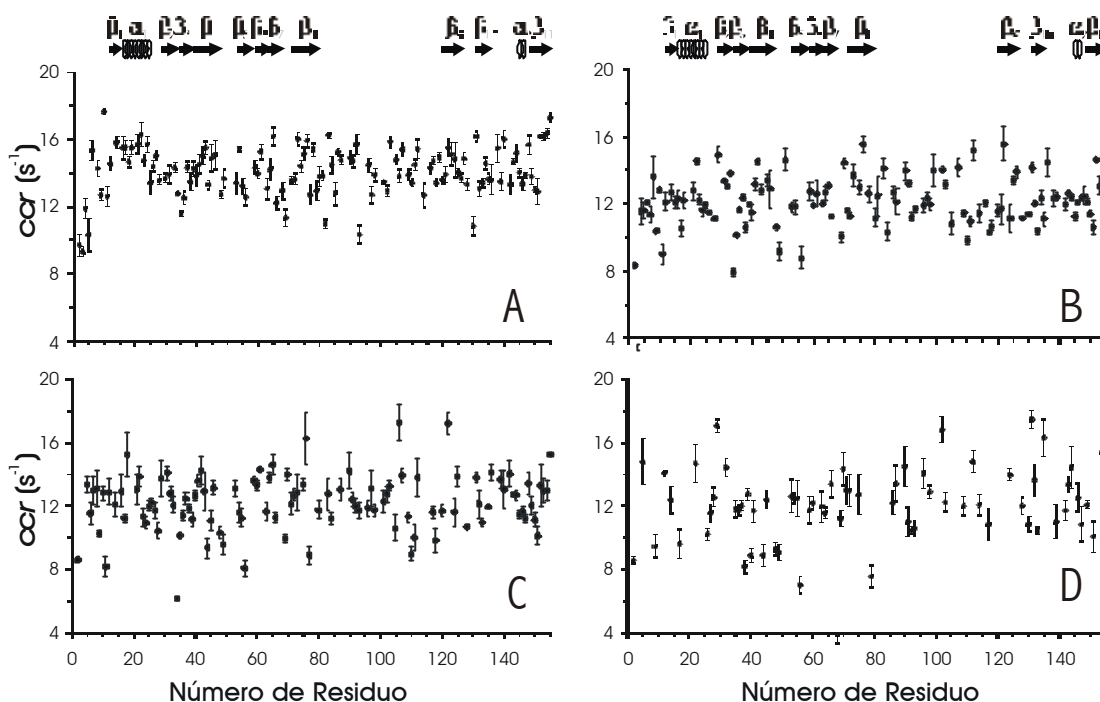
Un análisis cuantitativo de la correlación cruzada entre la interacción dipolar de los núcleos de  $^{15}\text{N}$  y de  $^1\text{H}$  y la *CSA* (apartado 3.4 de Fundamentos Teóricos) de los núcleos de  $^{15}\text{N}$  es, con un

margen de error de entre un 5 % y un 10 %, una herramienta muy útil para caracterizar la dinámica interna rápida de proteínas<sup>490,552</sup>. Hemos determinado las velocidades de relajación cruzada, *CCR* (apartado 3.4 de Fundamentos Teóricos), para los pares <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H de Rc en sus dos estados de oxidación y a diferentes concentraciones.

#### a) *Rusticianina reducida*

De los 140 grupos N-H del esqueleto, obtuvimos 127 valores consistentes de *CCR* en la forma reducida de Rc. Los resultados se muestran en la Figura 66-A. Comparando estos datos con los de la Figura 65-A, se observa que los valores de *CCR* por residuo siguen un comportamiento paralelo a los valores de  $S^2$ , confirmando que ambos parámetros son complementarios y consistentes. El valor medio obtenido fue  $14.1 \pm 1.0 \text{ s}^{-1}$ . Dos regiones presentan valores de *CCR* más altos que esta media: la primera hélice- $\alpha$ , aminoácidos 10-20 (Tabla 21), con un valor de *CCR* medio de  $14.9 \text{ s}^{-1}$ ; y la hebra- $\beta$  IX en la región C-terminal, residuos 148-155 (Tabla 21), cuyo valor de *CCR* es  $15.2 \text{ s}^{-1}$ . Los residuos Ala10 y Lys155, que pertenecen a las regiones citadas anteriormente, poseen los valores más altos de *CCR* de toda la proteína. Exceptuando los aminoácidos del extremo N-terminal, los valores más bajos corresponden a los residuos Gly35, Gly82, Gly93 y Thr130, que se encuentran en diferentes lazos de Rc.

Hemos realizado una serie de experimentos para obtener los valores de *CCR* a diferentes concentraciones de proteína, 1.0, 0.5, y 0.3 mM (Figuras 66-B, C y D). La finalidad de este estudio era determinar el posible estado de agregación de la rusticianina en nuestras condiciones iniciales de trabajo (3.0 mM). El valor medio de *CCR* obtenido en las muestras diluidas fue:  $12.1 \pm 0.8 \text{ s}^{-1}$  (1.0 mM),  $11.8 \pm 1.1 \text{ s}^{-1}$  (0.5 mM) y  $12.0 \pm 1.2 \text{ s}^{-1}$  (0.3 mM). Estos valores nos permiten afirmar que no se produce agregación para concentraciones de proteína iguales o menores de 1.5 mM. No obstante, los valores de *CCR* obtenidos en las muestras diluidas son un 14 % menores que el de la muestra a 3.0 mM. Como las velocidades de correlación cruzada son directamente proporcionales a  $\tau_r^{490}$ , consideramos que Rc se encuentra ligeramente dimerizada (entre un 10 y un 20 %) en las condiciones empleadas en los estudios de relajación. El comportamiento paralelo observado entre los valores de *CCR* y de  $S^2$  (comentado anteriormente) pone de manifiesto que la pequeña agregación que sufre la rusticianina no afecta al patrón movilidad de cada región de la proteína. En consecuencia, las conclusiones obtenidas mediante el análisis *model-free* son completamente trasladables a la forma monómera.

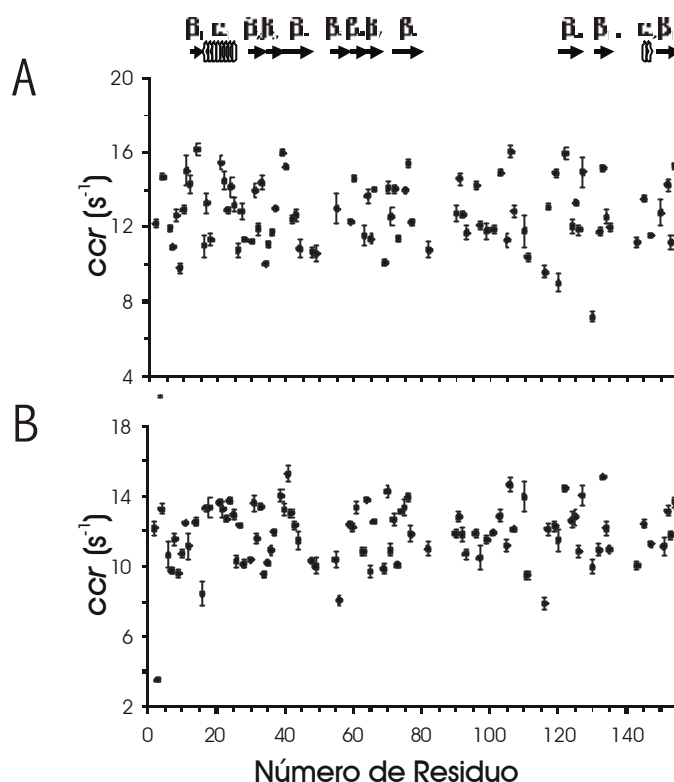


**Figura 66.** Velocidades de correlación cruzada por residuo de Cu(I)Rc: A) 3.0 mM; B) 1.0 mM; C) 0.5 mM; D) 0.3 mM. El resto de las condiciones de las muestras son las mismas que en la Figura 63.

*b) Rusticianina oxidada*

En la Figura 67 se muestran las velocidades de correlación cruzada para cada residuo de Cu(II)Rc a dos concentraciones diferentes (2.2 y 1.0 mM). Si comparamos los resultados obtenidos para la rusticianina en estado reducido y oxidado (Figuras 66 y 67), no se observa una desviación significativa entre ambos conjuntos de valores. Las mayores diferencias se encuentran en las proximidades del ion metálico. Este último efecto se debe a la relajación rápida que experimentan los núcleos próximos al centro paramagnético, y no está relacionado con la dinámica de la proteína.

El valor medio de *ccr* de Cu(II)Rc a una concentración 1.0 mM es  $11.8 \pm 1.2 \text{ s}^{-1}$ . Se trata del mismo resultado, considerando el error, que el obtenido para Cu(I)Rc a la misma concentración ( $12.1 \pm 0.8 \text{ s}^{-1}$ ). El valor medio de *ccr* para Cu(II)Rc a la concentración de 2.2 mM fue  $12.6 \pm 1.1 \text{ s}^{-1}$ . De nuevo, este incremento en el valor medio de la velocidad de correlación cruzada nos indica la existencia de agregación, aunque el porcentaje es muy pequeño (menor del 10 %).



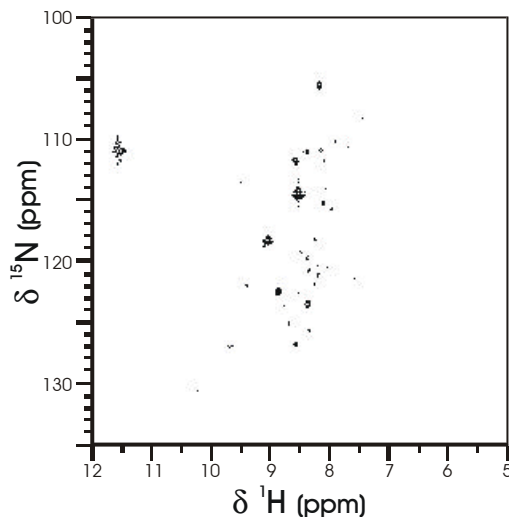
**Figura 67.** Velocidades de correlación cruzada por residuo de Cu(II)Rc: A) 2.2 mM; B) 1.0 mM.

#### 4.4. Accesibilidad del Disolvente

##### a) *Protones de intercambio rápido*

El experimento *cleanex* (apartado 2.7 de Materiales y Métodos) nos permite detectar los protones amida que se intercambian con los del disolvente en la escala de tiempo de micro- a milisegundos. Así, es posible identificar las regiones de la proteína más accesibles al disolvente. En la Figura 68 se muestra el espectro *cleanex* obtenido para Cu(I)Rc. En comparación con el espectro HSQC de Cu(I)Rc (Figura 62-A), se observan relativamente pocos picos de cruce en este experimento. Esto indica que la mayoría de residuos se encuentran en un ambiente altamente hidrofóbico, poco accesible para las moléculas de agua. Sólo diez residuos (Gly28, Ser34, Thr36, Gly48, Val56, Lys60, Asp73, Ala97, Gly118 y Tyr136) presentan señales con bastante intensidad. En la Figura 69 se observa (en color violeta) la disposición de estos residuos en Rc.

La región de los lazos adyacentes a la hebra- $\beta$  III (aminoácidos incluidos entre el 28 y el 36, Tabla 21) es una de las más accesibles al disolvente y, por lo tanto, susceptible de sufrir fenómenos de intercambio. Los protones amídicos de algunos de estos residuos (Gly28, Asp29, Ser34, Gly35, Lys36) están orientados hacia el disolvente.

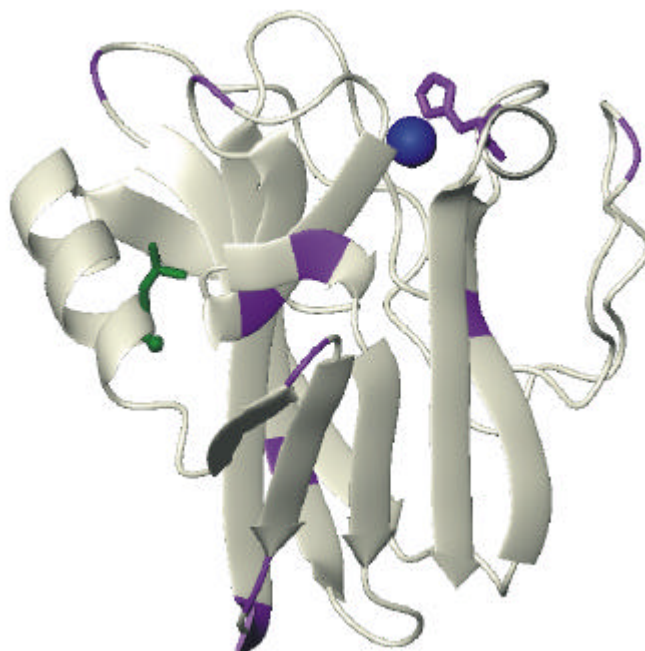


**Figura 68.** Espectro *cleanex* de Cu(I)Rc (1.2 mM, acetato sódico 0.1 M, pH 5.5, 296 K).

Los protones HN de los residuos Gly48, Gly118 y Ala97 también intercambian rápidamente con el disolvente. Estos aminoácidos se encuentran en dos de los lazos norte de la proteína. Los otros cuatro protones amida que aparecen en el espectro *cleanex*<sup>506</sup> (Val56, Lys60, Asp73 y Tyr136, Figura 68) se encuentran en la estructura barril- $\beta$  (Tabla 21 y Figura 69). Es interesante destacar que Val56 y Lys60 están en, o cerca de, la hebra- $\beta$  VI (Tabla 21) que está alineada antiparalelamente con la hebra- $\beta$  V. La hebra- $\beta$  VI es una subestructura característica particular de Rc, no presente en el resto de las BCPs<sup>371</sup> (Tabla 21). Queremos recalcar también que Tyr136 (hebra- $\beta$  X, Tabla 21), de acuerdo con la estructura tridimensional de Rc<sup>330,370</sup>, está aparentemente protegida del disolvente por el largo lazo que comprende los residuos 80-119 (Tabla 21). Por lo tanto, este lazo es lo suficientemente flexible como para permitir a las moléculas de agua interactuar con la hebra- $\beta$  X.

La señal más intensa en el experimento *cleanex* (Figura 68) corresponde a un protón amida de una cadena lateral, concretamente al protón H $\epsilon$ 2 de His143, un ligando del cobre. Esta señal supone una evidencia espectroscópica del grado de exposición al disolvente de este grupo imidazol. En otras BCPs, el protón análogo participa en fenómenos de auto-transferencia electrónica por medio de moléculas de agua<sup>384,553</sup>. Rc probablemente posee la misma dependencia cinética que

estas otras BCPs, aunque no se ha demostrado nada al respecto. La alta exposición de este protón al disolvente es una prueba adicional de que en Rc sucede algo similar al resto de las BCPs. El intercambio HN/H<sub>2</sub>O para este protón amida también se ha observado en CoRc (Capítulo 1) y en otras BCPs<sup>377</sup>.



**Figura 69.** Mapa de Rc donde se representan los protones amida en intercambio rápido con el disolvente (color violeta) obtenidos mediante el experimento *cleanex*. Se representa también la cadena lateral de His143 cuyo protón NH $\epsilon$ 2 intercambia muy rápidamente con el H<sub>2</sub>O (parte superior de la Figura). En verde se ha representado la molécula de agua estructural detectada con el experimento ePHOGSY que se encuentra cercana al aminoácido Leu19.

### b) Intercambio H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O

Hemos realizado una serie de experimentos HSQC de <sup>15</sup>N con una muestra de Rc recién preparada en D<sub>2</sub>O. También se realizaron a partir de las tres horas después del intercambio H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O y durante las dos semanas siguientes, a intervalos crecientes de tiempo (al principio cada hora, luego cada tres horas y finalmente cada día). La finalidad de estos experimentos era determinar el grado de accesibilidad de los protones amídicos al disolvente.

Cuarenta y siete residuos de los 136 asignados (34.6 %) no aparecen en el experimento realizado a las tres horas del intercambio del disolvente (poseen por lo tanto una velocidad de intercambio H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O,  $R_{\text{exch}}$  mayor a  $10^{-4}$  s<sup>-1</sup>). Cincuenta grupos N-H amida (36.7 %) han perdido

menos de la mitad de la intensidad de sus señales pasados once días ( $R_{exch} < 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ). Los restantes aminoácidos presentan un comportamiento intermedio ( $10^{-6} \text{ s}^{-1} < R_{exch} < 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ).

En la Figura 70 hemos representado esquemáticamente estos resultados. Los 47 residuos cuyos protones HN intercambian rápidamente con el  $\text{D}_2\text{O}$  se representan de color malva claro en la Figura. Estos aminoácidos se encuentran al principio de la secuencia, en la hebra- $\beta$  I, en la región 26-37, o distribuidos entre los lazos que conectan las hebras del barril- $\beta$  (Tabla 21, Figura 12-B). La región hidrofílica más larga corresponde a la región que se encuentra entre los aminoácidos 93-130 (comprende parte del largo lazo 80-119 y la hebra- $\beta$  IX, Tabla 21, Figura 12-B) que, al mismo tiempo, están formando una hoja- $\beta$  antiparalela con la hebra- $\beta$  I.



**Figura 70.** Vista esquemática del esqueleto de Rc donde se muestran los protones amida en intercambio  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  rápido (color malva), intermedio (color naranja) y lento (color marrón).

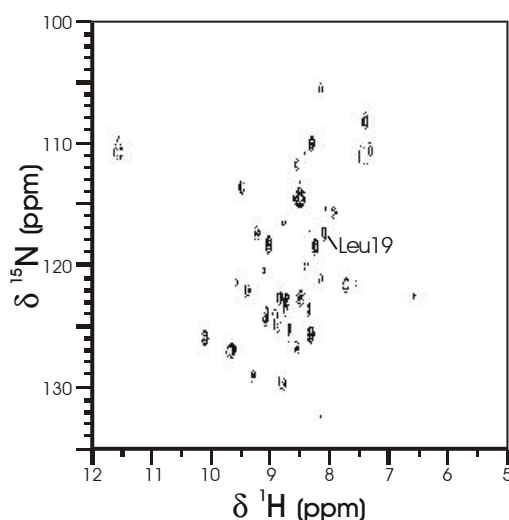
Cuarenta de los cincuenta residuos que intercambian lentamente (en color marrón, Figura 70) están ubicados en elementos de estructura secundaria característicos de la topología clásica de las BCPs (Figura 12-B): veintinueve pertenecen a la estructura barril- $\beta$ ; otros tres se encuentran en la región de la pequeña hélice- $\alpha$  II, cercana al centro de cobre (Tabla 21); y ocho se disponen en



lazos. Los diez residuos restantes están ubicados en la extensión N-terminal característica de Rc, situada al final de la hélice- $\alpha$  I y las hebras- $\beta$  II y III (Tabla 21, Figura 12-B).

### c) Moléculas de agua estructurales

En un experimento ePHOGSY<sup>511,554</sup> (Figura 71) los picos observados pueden derivar de un NOE directo entre grupos N-H de la proteína y una molécula de agua. En este caso, esta molécula de agua debe encontrarse unida a la proteína durante un tiempo superior al  $\tau_r$  de la proteína, es decir, se encuentra, en cierta manera, “atrapada” en la estructura de la macromolécula. Sin embargo las señales observadas en un espectro ePHOGSY pueden provenir de otros efectos en ausencia de NOEs HN-H<sub>2</sub>O reales<sup>555</sup> (apartado 2.7 de Materiales y Métodos). Los efectos de difusión de espín durante el tiempo de mezcla, los NOEs no deseados debidos a protones H $\alpha$  con el mismo desplazamiento químico que el agua y NOEs derivados del intercambio rápido de protones amida pueden, efectivamente, originar señales en el experimento ePHOGSY. Tras considerar todos estos efectos, llegamos a la conclusión de que, de todos los picos observados en este espectro (Figura 71), sólo la señal correspondiente a Leu19 proviene de un verdadero NOE HN-H<sub>2</sub>O. Esta molécula de agua estructural (representada de color verde en la Figura 69) se encuentra entre la hélice- $\alpha$  I y la banda- $\beta$  IV (Tabla 21, Figura 12-B). Esta posición equivaldría a la superficie de la proteína en otras BCPs en las que la hélice- $\alpha$  I no existe (Tabla 21). El hecho de que esta molécula esté retenida en esta posición indica una estructura bastante rígida entre el dominio N-35 terminal (ver más adelante) y el barril- $\beta$  de Rc.



**Figura 71.** Espectro ePHOGSY de Cu(I)Rc con un tiempo de mezcla de 30 ms (1.2 mM, acetato sódico 0.1 M, pH 5.5, 296 K).

#### 4.5. Movilidad de Rc comparada con otras BCPs

Todas las BCPs tienen una estructura rígida debido al plegamiento de la proteína impuesto por la topología de barril- $\beta$  y por la gran cantidad de enlaces de hidrógeno que poseen estas proteínas. Estas propiedades permiten que la transferencia electrónica tenga lugar con una energía de reorganización alrededor del ion metálico muy baja<sup>261,265,344</sup>. La rigidez de estas proteínas se evidencia mediante los estudios de movilidad. En todas las BCPs estudiadas, el valor medio del parámetro de orden,  $S^2$ , es relativamente alto (0.87 en Pc<sup>534</sup>, 0.86 en Az<sup>537</sup>, 0.83 en PsAz<sup>547</sup>) lo cual confirma las hipótesis anteriores. En el caso de Rc, el valor medio de  $S^2$ ,  $0.93 \pm 0.03$ , así como el valor medio del NOE, 0.83, son indicativos del bajo grado de movimientos internos que tienen lugar en la proteína, incluso cuando se compara con el resto de BCPs.

Para llegar a comprender bien las propiedades termodinámicas de Rc, destacaremos las regiones de la proteína que son estructuralmente diferentes de las otras BCPs y, más específicamente, aquellas que poseen características dinámicas peculiares. A modo de resumen, podemos decir que los elementos de Rc que presentan un cierto grado de movimientos internos son las regiones: 1-5, 35-38, 57-58, 66-70, 93-96. En los apartados siguientes intentaremos realizar una interpretación de los resultados obtenidos para cada una de estas regiones.

##### a) *Movilidad del dominio N-35 terminal*

La rusticianina posee, con respecto al resto de las BCPs, una región adicional de 35 aminoácidos en el extremo N-terminal<sup>370,371</sup> (Figura 64). Esta extensión está formada por una larga hélice- $\alpha$  (hélice I, Tabla 21), así como por tres hebras- $\beta$  (hebras I, II y III, Tabla 21). Tanto los valores de  $S^2$  como de  $ccr$  indican que la región 5-33 tiene poca movilidad. De hecho, el residuo con el valor de  $ccr$  más alto de toda la proteína es Ala10 ( $17.6 \text{ s}^{-1}$ ) y cinco de los diecisiete residuos que presentan un valor de  $ccr$  considerablemente mayor de la media están situados entre el aminoácido 10 y el 24. Además, la larga y anfipática hélice- $\alpha$  I parece ser, junto con el extremo C-terminal, la zona más rígida de toda la molécula (Figura 65). Por el contrario, los extremos de este dominio N-35 terminal (regiones 1-5 y 33-38) se caracterizan por presentar movimientos internos en la escala de tiempo de subnanosegundos (Figuras 65 y 66). Por lo tanto, la región que conecta el clásico barril- $\beta$ , típico de todas las BCPs, con la extensión N-35, sólo presente en Rc, actúa como un elemento de conexión flexible entre dos dominios distintos, estructuralmente bien definidos y bastante rígidos.

Por otra parte, estudios cristalográficos revelan que la extensión N-terminal actúa como un cinturón con respecto al plegamiento barril- $\beta$  típico<sup>330,543,544</sup> protegiéndolo, en cierta medida, del disolvente. Se ha propuesto esta región como el factor responsable de la alta estabilidad de la proteína en medios ácidos. Se ha demostrado, además, que el mutante de Rc al que se le ha

eliminado este extremo N-35 es soluble en medios ácidos<sup>371</sup>. En el mismo estudio se concluye también que esta región contribuye a la protección del corazón hidrofóbico de la proteína.

Nuestros estudios de intercambio HN/H<sub>2</sub>O revelan que el 36.7 % de los protones amídicos de Rc (50 de los 136 asignados) se encuentran protegidos del disolvente. Estudios análogos realizados en Pc<sup>534</sup> muestran que el porcentaje de protones amida que no se intercambian con el disolvente es mucho menor, sólo el 17.2 % de residuos (16 de los 93 asignados). Teniendo en cuenta que la diferencia estructural más importante entre estas dos proteínas reside en la carencia de Pc de la extensión N-35 (Figura 64), llegamos a la conclusión de que este dominio es esencial para mantener el alto grado de exclusión al disolvente de los residuos de Rc.

En consecuencia, el dominio N-35 sirve para incrementar la naturaleza hidrofóbica del corazón de la típica topología de barril- $\beta$  de Rc<sup>371</sup>. Siguiendo con el mismo discurso, no es de extrañar que la región situada entre la extensión N-terminal y el barril- $\beta$  presente propiedades de hidratación particulares (Figura 70).

### *b) Otras regiones con movimientos rápidos*

Otra región caracterizada por movimientos internos rápidos es el giro que comprende los aminoácidos 93-97 (Gly-Pro-Pro-Tyr-Ala). Los pequeños valores de *ccr* detectados para los residuos 93 y 97 (10.34 s<sup>-1</sup> y 12.72 s<sup>-1</sup>, Figura 66) y el bajo valor del NOE <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N del residuo 96 (Figura 63-C) confirman esta afirmación. Así mismo, Ala97 es también el residuo que intercambia más rápidamente con las moléculas de agua, como se observa en el experimento *cleanex* (Figuras 68 y 69). Los residuos equivalentes en otras BCPs (46-49 en Pc, 74-76 en Az, 52-56 en PsAz, Tabla 21) presentan un alto grado de movilidad en la misma escala de tiempo, a pesar de que estas regiones no contienen ninguna prolina. De hecho, ésta es la región más móvil para estas proteínas (a excepción del extremo N-terminal). Este giro forma parte del largo lazo que une las hebras- $\beta$  VIII y IX (Tabla 21).

La movilidad del lazo más largo de Rc, que comprende los aminoácidos de 80-119, es bastante peculiar (Figura 64-A). El primer dominio (residuos 83-92) tiene, esencialmente, valores de *S*<sup>2</sup> (el valor medio de *S*<sup>2</sup> en esta región es 0.93) similares a los del barril- $\beta$  (0.94), incluso cuando no hay una estructura secundaria definida en esta región. La región equivalente en azurina (Figura 64-B) presenta una hélice- $\alpha$  (residuos 55-67, Tabla 21) y valores de *S*<sup>2</sup> muy altos<sup>537</sup>, aunque no tanto como Rc. Por el contrario, el lazo equivalente en PsAz (aminoácidos 35-63, Figura 64-C, Tabla 21) no contiene elementos de estructura secundaria y presenta un grado de orden mucho menor que en Az y Rc. Por lo tanto, la mayor rigidez de Rc con respecto a las otras BCPs no proviene del alto contenido de estructura secundaria o por una topología de barril- $\beta$  más compacta, sino que las interacciones terciarias deben ser determinantes.

---

### c) Movilidad en la escala de tiempo de milisegundos

His57 y Asp58 se caracterizan por velocidades de relajación transversal operativas en la escala de milisegundos (Figura 63-B). El intercambio conformacional observado probablemente se debe a un rápido equilibrio de protonación/desprotonación del anillo imidazólico de His57 ya que su  $pK_a$  coincide con el pH de trabajo (5.5). Este fenómeno de intercambio conformacional se pone también de manifiesto mediante el análisis *model-free*: estos residuos presentan valores de  $R_{ex}$  (ecuación 28 de Fundamentos Teóricos) de 16.2 y 25.7  $s^{-1}$ , respectivamente (Figura 65-B). Por otra parte, los protones amida de los residuos Val56 y Lys60, que pertenecen al mismo lazo, intercambian rápidamente con los protones del disolvente como se deduce por los intensos picos obtenidos en el experimento *cleanex* (Figuras 68 y 69). Es posible que tanto el intercambio en la escala de tiempo de milisegundos, como el intercambio con el disolvente de ese lazo no presente en otras BCPs, estén relacionados. Mediante el presente estudio no podemos deducir la relevancia fisiológica de este movimiento conformacional, si es que existe.

En la azurina, se ha observado un intercambio conformacional en la escala de tiempo de milisegundos para Gly37<sup>537</sup>. En este caso, el intercambio está relacionado con las propiedades ácidas de His35. Esta histidina es la responsable de pequeños cambios conformacionales que sufren ciertos residuos cercanos al ion metálico y que, en último término, provocan el cambio del potencial redox de Az con el pH<sup>384</sup>. His57 de Rc no está situada en una posición equivalente a His35 en Az (Tabla 21), al contrario, His57 se encuentra bastante lejos del centro metálico (17 Å). No parece plausible, por lo tanto, relacionar el cambio conformacional observado en el presente estudio en His57 con el cambio conformacional de His35 en Az.

En la pseudoazurina, el residuo equivalente a Gly37 de Az, es Lys36, que también sufre intercambio conformacional en la escala de tiempos de milisegundos, a pesar de que en esta región no existe ningún aminoácido histidina<sup>547</sup>. El residuo equivalente en Rc es Asn80. No hemos observado movilidad para ese residuo en la escala de tiempo de milisegundos. En esa región el único residuo que presenta movilidad rápida es Thr79, pero en la escala de tiempo de subnanosegundos. No está claro si esta movilidad está relacionada con fenómenos de intercambio conformacionales como los observados para Az y PsAz.

#### 4.6. Propiedades Dinámicas del Entorno de Coordinación del Cobre

Tres de los ligandos del cobre (Cys138, His143, y Met148) pertenecen a las dos hebras- $\beta$  en el extremo C-terminal de Rc o al lazo que las une (Tabla 21) (Capítulo 2 de Resultados, Figura 52). Nuestros datos muestran que estas dos hebras- $\beta$  forman, en Rc, una de las regiones más rígidas y protegidas de la interacción con el disolvente de toda la molécula. Como hemos comentado en los Capítulos previos, las propiedades estructurales y de los ligandos Cys138 y Met148 están determinadas por las interacciones de estas dos hebras- $\beta$ . Las propiedades dinámicas de estos dos ligandos también podrían ser consecuencia de estas mismas interacciones. En otras palabras, la gran rigidez e hidrofobicidad de las dos hebras- $\beta$  antiparalelas X y XI son transmitidas, en cierta medida, al centro activo. Un ambiente altamente hidrofóbico del ion metálico puede incrementar el potencial redox de la proteína<sup>370,556</sup> y está de acuerdo con la hipótesis del estado *entático*<sup>261,298</sup> (Capítulo 3 de Introducción). Por otro lado, la rigidez también explicaría la facilidad de interconversión cobre(I)/cobre(II).

Los otros dos ligandos, His85 e His143, tienen también valores de  $S^2$  muy altos (0.96 y 0.94, respectivamente), ratificando con ello la rigidez del centro metálico. El carácter hidrofóbico del lazo que liga al cobre no impide que His143 interactúe con una molécula de agua a través de su anillo imidazol. Esta interacción, observada experimentalmente en este trabajo, es esencial para la autotransferencia electrónica en BCPs<sup>384</sup>.

No hemos observado ninguna diferencia significativa al comparar las velocidades de correlación cruzada de Cu(I)Rc y Cu(II)Rc. Esta independencia de la dinámica local con respecto al estado de oxidación de Rc, coincide con los estudios realizados previamente en Pc<sup>534</sup>. Sin embargo, en otras proteínas de transferencia electrónica, como diversos citocromos<sup>557</sup>, el comportamiento encontrado es justo el opuesto. Nuestro estudio dinámico, así como el estudio realizado en Cu(II)Rc (Capítulo 2 de Resultados), indica que el plegamiento de Rc proporciona una estructura rígida que evita cambios conformacionales en el entorno del ion metálico.

Llegados a este punto, es importante destacar que, de entre todas las BCPs caracterizadas hasta ahora, el valor medio del parámetro de orden sigue la misma tendencia que el potencial de reducción. El parámetro de orden es mayor cuanto mayor es el potencial de reducción, siguiendo el orden: Rc > Pc > Az > PsAz. Debido a los pocos datos disponibles<sup>534,537,547</sup> y las mínimas diferencias que existen entre los valores medios de  $S^2$ , no podemos llegar a una conclusión determinante. Sin embargo, si se confirmara con otros datos, el hecho de que existe una relación entre las tendencias que siguen los potenciales redox y el parámetro de orden, podría suponer un aspecto fundamental de la relación estructura-función en BCPs.

## 5. Estructura de CaCeCb: Relevancia de las Restricciones Paramagnéticas

El cálculo de estructuras en disolución mediante RMN se ha basado, tradicionalmente, en restricciones de distancias (obtenidas, en general, mediante el efecto NOE) y angulares (derivadas de constantes de acoplamiento)<sup>28,558</sup>. Las distancias no son exactas porque la intensidad de los NOEs depende de otros factores como la movilidad y la difusión de espín. Por otra parte, las restricciones angulares se utilizan con una tolerancia muy grande. Como consecuencia, sólo puede obtenerse una estructura refinada con un alto número de restricciones, a pesar de que éstas no sean, intrínsecamente, muy precisas. Las restricciones paramagnéticas (como son los desplazamientos de pseudocontacto, los acoplamientos dipolares residuales, las velocidades de relajación nuclear...) suponen, en las proteínas que presentan un metal paramagnético o bien en aquellas en las que se pueda incluir, una fuente adicional de información que nos llevará a la obtención de una estructura con un grado mayor de resolución.

En este capítulo hemos realizado un análisis comparativo de la importancia relativa de las restricciones basadas en propiedades paramagnéticas y las restricciones clásicas en el cálculo de estructuras de proteínas en disolución. Para ello hemos trabajado con la proteína calbindina D<sub>9K</sub>, Ca<sub>2</sub>Cb (Capítulo 4 de Introducción). Hemos sustituido uno de sus iones calcio por iones lantánidos, obteniendo el derivado CaLnCb (donde Ln significa lantánido). El objetivo es obtener información adicional de los iones paramagnéticos, para refinar la estructura de la proteína en disolución. Los resultados demuestran no sólo que las restricciones paramagnéticas son consistentes y complementarias con las diamagnéticas, sino que la combinación de los dos tipos de restricciones permiten obtener una estructura en disolución altamente refinada. Así mismo, también hemos estudiado la importancia del número y de la clase de los NOEs en el cálculo de estructuras de proteínas.

## 5.1. Clases de Restricciones

En la Tabla 22 se muestran todas las restricciones utilizadas por el programa PSEUDYANA<sup>144</sup> (Capítulo 1 de Fundamentos Teóricos) para el cálculo de la estructura de Cb. Las hemos agrupado de acuerdo con su carácter diamagnético o paramagnético. Las restricciones diamagnéticas son todas de corto alcance (NOEs y restricciones angulares obtenidas a partir de las constantes de acoplamiento, <sup>3</sup>J). También las restricciones paramagnéticas pueden ser de corto alcance como es el caso de las velocidades de relajación y las restricciones metal-ligando. No obstante, ciertas restricciones paramagnéticas, como los desplazamientos de pseudocontacto y los acoplamientos dipolares residuales, son de largo alcance.

**Tabla 22.** Restricciones utilizadas en los cálculos con PSEUDYANA.

<i>Tipo de Restricción</i>	<i>Número de Restricciones</i>
<b>Restricciones Diamagnéticas</b>	
NOESY	2164 (1793 significativas)
1D NOE	30 (13 significativas)
Puentes de Hidrógeno	15 (30 límites de distancia superiores, 15 límites inferiores)
Ángulo $\phi$	59
Ángulo $\psi$	46
Ángulo $\chi$	86 (restricciones de asignación estereoespecífica)
Total Restricciones diamagnéticas	2042 significativas
<b>Restricciones Paramagnéticas</b>	
$R_i$	26
$rdc$	64
$\rho_{CS}$ (de 11 lantánidos)	1738 (562 N, 573 HN, 156 C de Ce <sup>3+</sup> , 447 HC de Ce <sup>3+</sup> )
Total Restricciones Paramagnéticas	1838
<b>Total Restricciones</b>	<b>3880</b>

---

Todas las restricciones del presente estudio se utilizaron en el derivado de Ce(III), CaCeCb. Además, en el cálculo de la estructura, se incluyeron también restricciones derivadas de los desplazamientos de pseudocontacto de los derivados metalosustituídos de Cb por otros lantánidos, CaLnCb (con Ln = Ce<sup>3+</sup>, Pr<sup>3+</sup>, Nd<sup>3+</sup>, Sm<sup>3+</sup>, Eu<sup>3+</sup>, Tb<sup>3+</sup>, Dy<sup>3+</sup>, Ho<sup>3+</sup>, Er<sup>3+</sup>, Tm<sup>3+</sup>, Yb<sup>3+</sup>).

A continuación detallamos el origen de cada una de las restricciones utilizadas.

### a) Restricciones de origen diamagnético

#### a.1) NOEs

Las restricciones NOESY (Tabla 22) que hemos utilizado en este trabajo se habían obtenido previamente para el cálculo de la estructura que nos sirvió de punto de partida<sup>248</sup>. No hemos realizado ninguna nueva calibración de estas restricciones.

También se habían obtenido con anterioridad las 13 restricciones NOE 1D (Tabla 22) que hemos utilizado en el cálculo de la estructura<sup>248</sup>. Estas restricciones se obtuvieron a partir de la saturación de las señales más desplazadas, con contribución de contacto, del espectro de RMN de <sup>1</sup>H de CaCeCb. En este caso hemos ido recalibrando los valores a medida que se mejoraba la resolución de la estructura mediante el protocolo CALIBA<sup>433</sup>.

#### a.2) Ángulos diedros

Obtuvimos las restricciones de los ángulos diedros  $\mathbf{f}$ ,  $\mathbf{y}$ , y  $\mathbf{c}1$  a partir de las medidas de las constantes  ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$ , la relación  $I_{\text{HNH}\alpha}/I_{\text{HNH}\alpha-1}$  y los valores de  ${}^3J_{\text{HNH}\beta}$ , respectivamente, según se explica en el Capítulo 3 de Materiales y Métodos.

#### a.3) Puentes de hidrógeno

Mediante el experimento HNC0 específico para la detección de puentes de hidrógeno<sup>442</sup> se observan quince picos que corresponden a otros tantos puentes de hidrógeno (detallados en la Tabla 23) presentes en la calbindina D<sub>9k</sub>. Estos puentes de hidrógeno se traducen en restricciones de distancia como ya se ha especificado anteriormente (Capítulo 3 de Materiales y Métodos).



**Tabla 23.** Puentes de hidrógeno detectados.

<i>HN</i>	<i>O=C</i>
Leu6	Pro3
Ile9	Glu5
Phe10	Leu6
Tyr13	Phe10
Ala14	Phe10
Ala15	Glu11
Glu17	Glu27 (Oε) <sup>a</sup>
Asn21	Asp19 (Oδ) <sup>a</sup>
Leu28	Ser24
Leu32	Leu28
Glu35	Leu31
Lys41	Ser38
Leu49	Thr45
Leu53	Leu49
Gln75	Lys71

<sup>a</sup> Oxígenos carboxílicos de las cadenas laterales de estos aminoácidos.

## *b) Restricciones de origen paramagnético*

### *b.1) Velocidades de relajación*

En la Tabla 24 se detallan las velocidades de relajación longitudinal paramagnética,  $R_{1\text{para}}$ , correspondientes a los 22 protones y los 4 carbonos cercanos al metal paramagnético que determinamos y utilizamos como restricciones en los cálculos. Estas velocidades de relajación se obtuvieron de acuerdo con la ecuación 11 (Introducción) y se utilizaron los valores de  $R_{1\text{para}}$ , tal como se indica en el apartado 3.3 de Materiales y Métodos.

**Tabla 24.** Tiempos de relajación de los núcleos cercanos al metal paramagnético.

**<sup>1</sup>H**

<i>Asignación</i>	<i>R<sub>1</sub>para (s<sup>-1</sup>)</i>
Glu22 Hβ 1	1.38
Hβ 1	3.13
Hβ 2	1.60
Leu23 Hβ	1.82
Asp54 Hα	20.22
Asn56 Hβ 1	1.38
Gly57 Hα 1	4.37
Asp58 Hβ 1	1.88
Asp58 Hβ 2	3.62
Gly59 Hα 1	1.56
Glu60 Hα	1.85
Val61 Hα	15.24
Val61 Hγ 1	1.40
Val61 Hγ 2	2.76
Ser62 Hβ 1	2.48
Glu64 Hβ 1	2.22
Glu64 Hβ 2	1.61
Glu64 Hγ 1	2.78
Glu65 Hα	3.00
Glu65 Hγ 2	10.82
Glu65 Hγ 1	2.90
Hβ 1	2.52

**<sup>13</sup>C**

<i>Asignación</i>	$R_1^{para} (s^{-1})$
Asp54 C $\gamma$	0.552
Asn56 CO	0.193
Asn56 C $\gamma$	0.183
Asn61 C $\alpha$	0.676

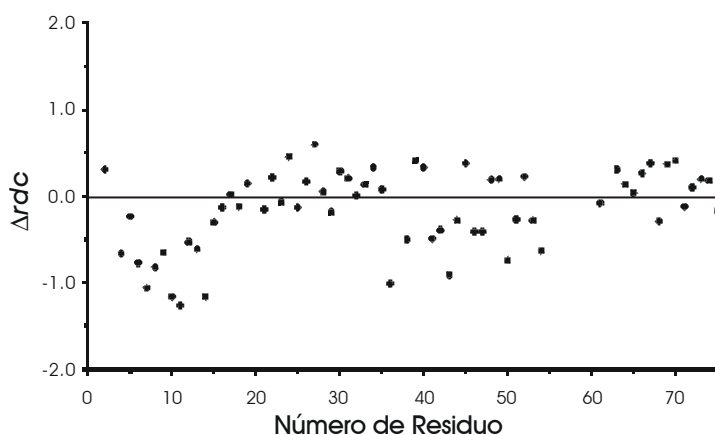
*b.2) Desplazamientos de pseudocontacto*

Como se indica en la Tabla 22, en los cálculos de la estructura se introdujeron un total de 1738 restricciones provenientes de desplazamientos de pseudocontacto. De éstos, 1135 corresponden a nitrógenos y protones amídicos, habiéndose obtenido 166 *pcs* del derivado CaCeCb y los restantes (969) de los demás derivados metálicos CaLnCb. Además, se incluyeron 156 y 447 *pcs* correspondientes a desplazamientos de carbono-13 y protones alifáticos para el derivado de Ce<sup>3+</sup>.

En cada uno de los cálculos se determinaba la orientación de los ejes magnéticos y la magnitud de las componentes principales del tensor de susceptibilidad magnética (apartados 2.3 de Introducción y 3.1 de Materiales y Métodos). Los valores finales obtenidos fueron  $\Delta\chi_{ax} = 2.10 \times 10^{-32} \text{ m}^3$  y  $\Delta\chi_{rh} = 0.80 \times 10^{-32} \text{ m}^3$ , en concordancia con los previamente publicados para el mismo sistema ( $\Delta\chi_{ax} = 2.08 \times 10^{-32} \text{ m}^3$  y  $\Delta\chi_{rh} = 0.71 \times 10^{-32} \text{ m}^3$ )<sup>249</sup>.

*b.3) Acoplamiento dipolar residual*

Introdujimos también, como restricciones en el cálculo de estructuras, los 64 valores de  $\Delta r_{dc}$  obtenidos previamente para los pares N-H del derivado CaCeCb<sup>219</sup>. En la Figura 72 se muestran estos valores.



**Figura 72.** Representación de los valores de  $\Delta rdc$  para cada uno de los pares N-H.

## 5.2. Calidad de la estructura

En el cálculo de las estructuras se han utilizado 3880 restricciones significativas (Tabla 22). El 52.3 % eran restricciones típicamente diamagnéticas, mientras que el resto provenían de la presencia de un metal paramagnético en la proteína.

En la Tabla 25 se muestra cómo contribuye cada restricción a la función diana total de la estructura. Las restricciones que más influyen a la TF son las paramagnéticas de largo alcance (68 %). Este hecho era presumible teniendo en cuenta el diseño de los programas de cálculo de estructuras en disolución. PSEUDYANA construye la estructura terciaria de la proteína modulando cambios locales, esto es, los provenientes de restricciones de corto alcance.

La estructura obtenida está formada por cuatro hélices y tres lazos. El primero de ellos corresponde al sitio donde se coordina el ion calcio. En el tercero se unen los iones lantánidos (Figura 17). En la Figura 73 se muestra una vista en estéreo de la representación “salchicha” de átomos del esqueleto correspondiente a los 30 confórmers con menor valor de función diana. Este conjunto de confórmers tiene una desviación estándar (*root mean square deviation, rmsd*) con respecto a las coordenadas de la estructura media para los átomos del esqueleto de  $0.25 \pm 0.07 \text{ \AA}$ . El *rmsd* de todos los átomos pesados para este conjunto de confórmers es  $1.09 \pm 0.10 \text{ \AA}$ . Esta estructura se encuentra depositada en el PDB con el nombre 1KQV.pdb.

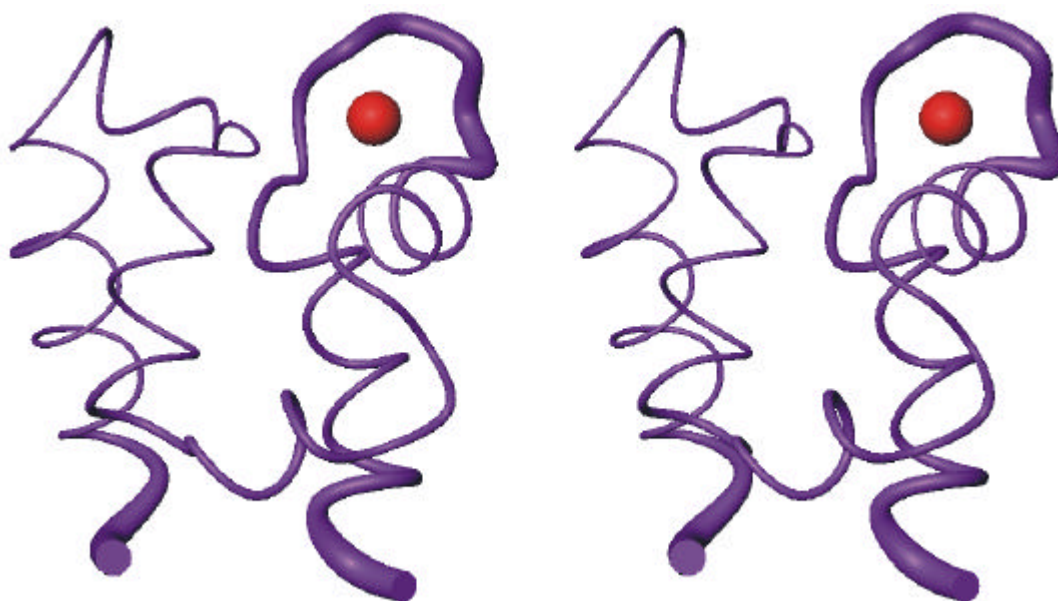
El efecto que produce la introducción de diferentes clases de restricciones en el cálculo de estructuras, se debe considerar desde dos puntos de vista complementarios: i) el efecto de las nuevas restricciones en la exactitud y precisión de la estructura; ii) la consistencia de todas las restricciones (diamagnéticas y paramagnéticas) entre sí.

**Tabla 25.** Contribución a la función diana total de la estructura final de cada uno de los grupos de restricciones.

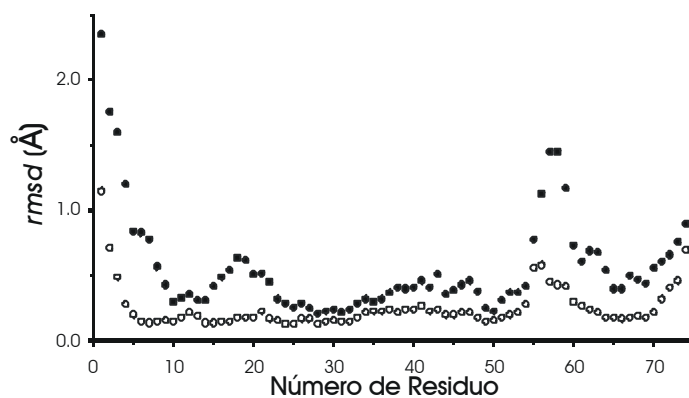
<i>Tipo de Restricción</i>	<i>Contribución (%)</i>
<b>Restricciones Diamagnéticas</b>	
Van der Waals	7.4
Puentes de Hidrógeno	2.3
Tensores	1.0
Ángulos	3.4
1D NOE	0.0
NOESY	16.3
Total Restricciones diamagnéticas	30.4
<b>Restricciones Paramagnéticas</b>	
$R_1$	1.5
$rdc$	21.4
$pcs$ (de 11 lantánidos)	46.7
Total Restricciones Paramagnéticas	69.6

Si comparamos la estructura final de la calbindina D<sub>9k</sub> con la obtenida utilizando en los cálculos sólo las restricciones diamagnéticas (Figura 74), observamos una disminución significativa del *rmsd* respecto a la media, de 0.69 Å a 0.25 Å, que es nuestro parámetro de medida de la precisión. En la Figura 75 se muestra la familia de estructuras en disolución resuelta utilizando sólo restricciones diamagnéticas y la obtenida utilizando, además, las restricciones paramagnéticas. También aquí se observa claramente como la resolución es mucho mayor en la estructura calculada con todas las restricciones disponibles. La consistencia de la totalidad de las restricciones se hace patente por la disminución del *rmsd* en presencia de las restricciones paramagnéticas (Figura 74, círculos blancos) sin que aumente la función diana correspondiente a las restricciones diamagnéticas (Tabla 26). Así mismo, tampoco se incrementa el número de violaciones consistentes (sólo se observan 2 con una tolerancia de 0.1 Å). Estos datos demuestran que los dos conjuntos de restricciones (diamagnéticas y paramagnéticas) son completamente consistentes. La calidad de la estructura se observa también en

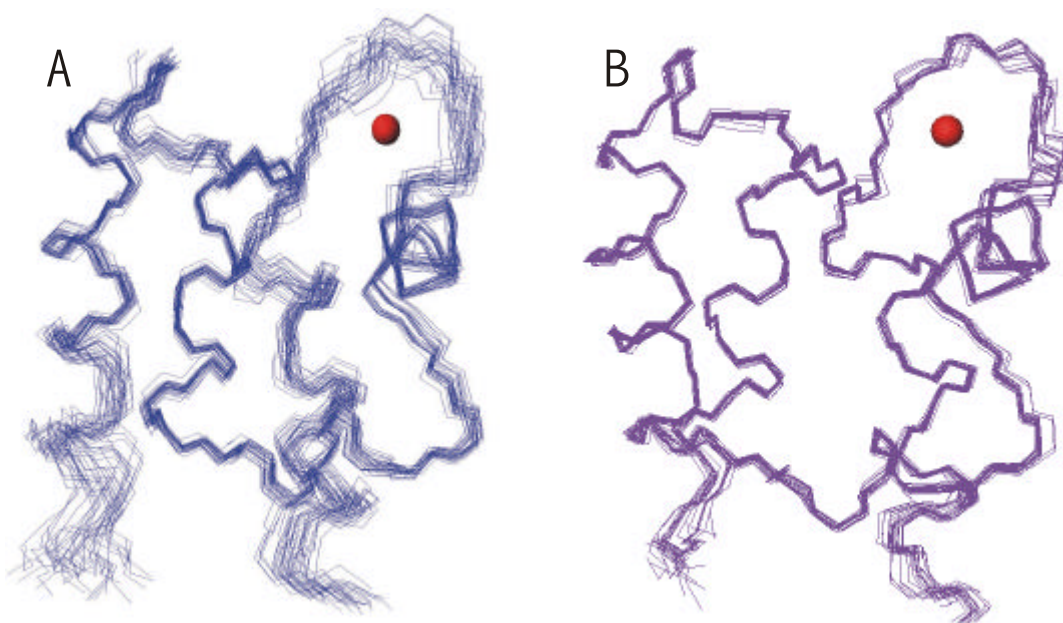
la representación de Ramachandran (Figura 76). El 92.3 % de los ángulos queda dentro de las regiones permitidas.



**Figura 73.** Vista estéreo de la representación salchicha de la familia de 30 conformeros que constituyen la estructura final (1KQV.pdb). La esfera roja representa el ion cerio(III).



**Figura 74.** Representación del *rmsd* de los átomos del esqueleto utilizando sólo las restricciones diamagnéticas (círculos negros), o todas las restricciones experimentales (círculos blancos).



**Figura 75.** Familia de 30 conformeros obtenidos con restricciones: A) diamagnéticas; B) todas las restricciones calculadas.

### **5.3. Análisis de las Restricciones Paramagnéticas**

Hemos analizado el efecto que las restricciones paramagnéticas ( $R_1^{\text{para}}$ ,  $pcs$ ,  $rdc$ ) tienen tanto en la resolución final de la familia de estructuras, como en la función diana global. Para llevar a cabo este estudio hemos realizado varios cálculos con el programa PSEUDYANA<sup>144</sup> eliminando, en cada uno de ellos, una clase o parte de una clase de restricciones. En total hemos realizado trece de estos cálculos. El objetivo era obtener información sobre el valor intrínseco y la complementariedad de cada una de las restricciones. En la Tabla 26 se dan los valores de los  $rmsd$  y de las TF de las familias obtenidas. Todas las familias constan de 30 conformeros. También se incluye en esta Tabla el  $rmsd$  de la estructura media de la familia, obtenida para cada tipo de restricciones, respecto a la estructura media de la familia obtenida en el cálculo final.

A continuación analizamos el efecto de cada uno de los tres tipos de restricciones originadas por el ion metálico ( $R_1$ ,  $pcs$  y  $rdc$ ) tanto en la resolución de las estructuras como en la función diana de las mismas. Para una mayor claridad de la discusión, en la Figura 77 representamos el  $rmsd$  del esqueleto por residuo de la estructura final y de la estructura obtenida cuando se elimina cada uno de los conjuntos de restricciones paramagnéticas. Así mismo, en la Figura 78 representamos también

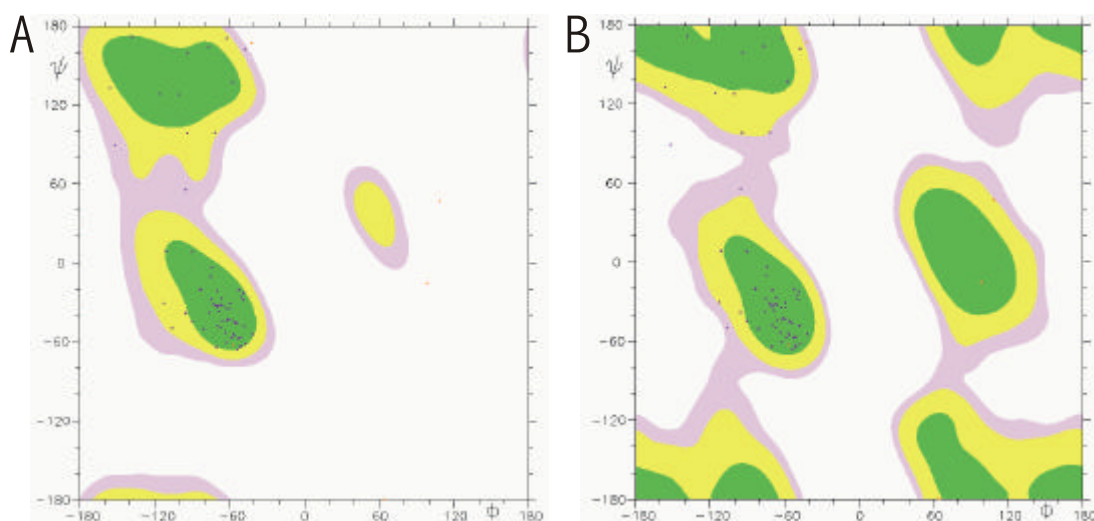
el *rmsd* por residuo cuando, además de las restricciones diamagnéticas, introducimos una sola de las restricciones paramagnéticas. Estas dos figuras nos permiten analizar detalladamente cómo afecta cada tipo de restricción a la resolución local de la estructura.

**Tabla 26.** Efecto de cada tipo de restricción paramagnética en la resolución de las estructuras finales.

Restricciones	Respecto Estructura Final	Valores estadísticos para cada Familia		Porcentaje de ángulos $\gamma$ $\phi$ en las regiones de Ramachandran			
	<i>rmsd</i> Esqueleto (Å)	<i>rmsd</i> Esqueleto (Å)	Función Diana (Å <sup>2</sup> )	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)
Todas	-	0.25±0.07	1.74-1.90	92.3	7.7	0	0
Sin <i>pcs</i> <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C	0.32	0.30±0.04	1.32-1.50	92.3	7.7	0	0
Sin <i>pcs</i>	0.59	0.43±0.09	0.66-0.74	84.6	15.4	0	0
Sin <i>rdc</i>	0.40	0.32±0.07	1.22-1.45	89.2	10.8	0	0
Sin <i>R</i> <sub>1</sub>	0.35	0.25±0.07	1.19-1.31	89.2	10.8	0	0
Sin <i>pcs</i> c.a. <sup>a</sup>	0.41	0.40±0.08	0.92-1.00	90.8	9.2	0	0
Sin <i>pcs</i> m.l.a. <sup>b</sup>	0.44	0.39±0.08	1.12-1.35	91.8	8.8	0	0
Sin <i>R</i> <sub>1</sub> ni <i>rdc</i>	0.46	0.33±0.05	0.74-0.88	86.2	13.8	0	0
Sin <i>R</i> <sub>1</sub> ni <i>pcs</i>	0.67	0.54±0.13	0.61-0.69	87.7	12.3	0	0
Sin <i>pcs</i> ni <i>rdc</i>	0.65	0.55±0.11	0.23-0.33	83.1	16.9	0	0
Sin <i>R</i> <sub>1</sub> , <i>rdc</i> ni <i>pcs</i> m.l.a.	0.61	0.54±0.08	0.43-0.70	90.8	9.2	0	0
Sin <i>R</i> <sub>1</sub> , <i>rdc</i> ni <i>pcs</i> c.a.	0.45	0.48±0.11	0.43-0.58	87.7	12.3	0	0
Sin <i>R</i> <sub>1</sub> , <i>rdc</i> ni <i>pcs</i>	0.90	0.61±0.13	0.22-0.30	84.6	15.4	0	0
Sin <i>R</i> <sub>1</sub> , <i>rdc</i> , <i>pcs</i> ni ligandos	1.01	0.69±0.18	0.22-0.32	83.1	15.4	1.5	0

A = regiones más favorecidas; B = regiones permitidas; C = regiones permitidas admitiendo una gran tolerancia; D = Regiones prohibidas. <sup>a</sup> c.a. = desplazamientos de pseudocontacto de corto alcance, producido por los iones metálicos: Ce<sup>3+</sup>, Pr<sup>3+</sup>, Nd<sup>3+</sup>, Eu<sup>3+</sup>, Sm<sup>3+</sup>. <sup>b</sup> m.l.a. = desplazamientos de pseudocontacto de medio y largo alcance, producido por los iones metálicos: Er<sup>3+</sup>, Yb<sup>3+</sup>, Tb<sup>3+</sup>, Dy<sup>3+</sup>, Ho<sup>3+</sup>, Tm<sup>3+</sup>.



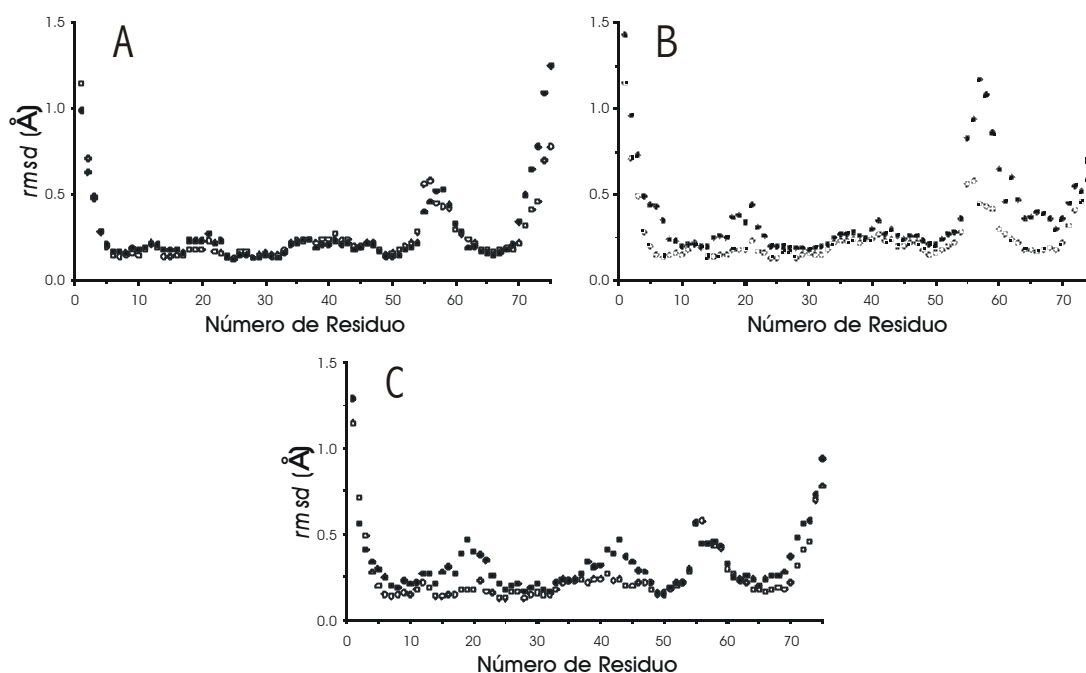


**Figura 76.** Representaciones de Ramachandran de la estructura 1KSM.pdb (media minimizada de la familia de estructuras). En color violeta se representan todos los residuos salvo las glicinas que se representan en naranja. A) Representación para los residuos con cadenas laterales; B) Representación de las zonas permitidas para las glicinas.

#### a) Velocidades de relajación longitudinal

Las 26 restricciones provenientes de las velocidades de relajación longitudinal no contribuyen a disminuir el valor global del *rmsd* (el valor global del *rmsd* es 0.25 Å al excluir este tipo de restricciones, Tabla 26). Sin embargo, estas restricciones sí contribuyen significativamente a la calidad de la representación de Ramachandran. Sin ellas hay un mayor número de residuos pertenecientes a la región central que se encuentran fuera de la zona permitida de la representación (Tabla 26). Por ello, aunque las estructuras sin las restricciones derivadas de las  $R_1$  tienen, prácticamente, el mismo *rmsd* y una función diana ligeramente inferior que la estructura final, consideramos que la estructura obtenida incluyendo las restricciones  $R_1$  es la más aceptable.

Por otro lado, las restricciones derivadas de las  $R_1$  mejoran considerablemente la estructura cuando no se utilizan otras restricciones paramagnéticas. Como se muestra en la Tabla 26, el *rmsd* del esqueleto disminuye de 0.61 Å a 0.55 Å cuando sólo se consideran las  $R_1$ . El efecto es similar al observado con los *rdc* (ver más adelante), aunque con las  $R_1$  está más focalizado en las inmediaciones del centro metálico (Figura 78-A).



**Figura 77.** Valores de *rmsd* de los átomos del esqueleto por residuo utilizando todas las restricciones (círculos blancos), frente al *rmsd* de los mismos átomos cuando, en los cálculos, se utilizaban todas las restricciones menos: A) las *R1*; B) los *pcs*; C) los *rdc* (círculos negros).

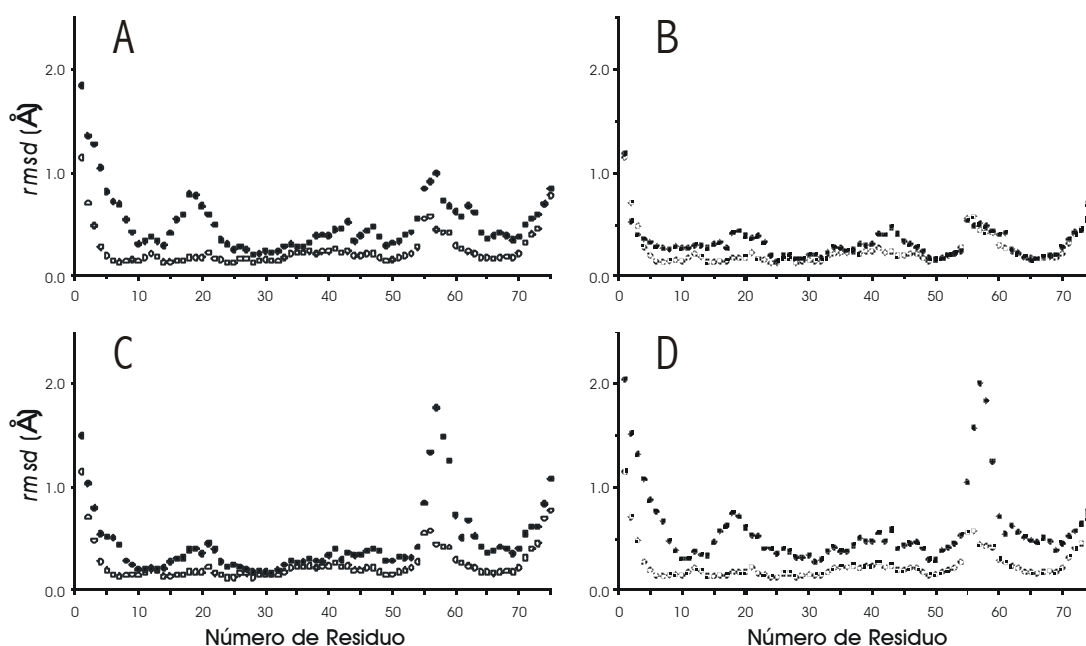
#### b) Restricciones de pseudocontacto

Los *pcs* son las restricciones paramagnéticas que más contribuyen a la calidad final de la estructura en disolución como se deduce de la Tabla 26. Sin esas restricciones el *rmsd* global aumenta de 0.25 Å a 0.43 Å. No obstante, esta reducción drástica del *rmsd* no nos informa por sí sola del valor de los *pcs*. De hecho, la reducción podría ser engañosa teniendo en cuenta el alto número de restricciones de este tipo utilizadas (1738, ver Tabla 22).

En la Tabla 27 se cuantifica la contribución de cada ion lantánido a la función diana de los *pcs*. La alta contribución de este conjunto de restricciones a la TF es debida al derivado CaCeCb, lo cual era de esperar teniendo en cuenta que este derivado proporciona el mayor número de restricciones. Recordemos que aquí están incluidas también aquellas restricciones provenientes de las señales de los protones alifáticos y también de los núcleos de  $^{13}\text{C}$  (Tabla 22).

Comparar el efecto local de las restricciones *pcs* resulta muy interesante (Figuras 77-B y 78-B). Cuando se utiliza un único ion metálico, el rango de acción de las restricciones paramagnéticas se reducen a una corteza esférica (con una superficie interna y otra externa) fuera de la cual estas restricciones no son operativas (Figura 20). Las señales pertenecientes a núcleos

muy próximos al centro activo se pierden, debido a las altas velocidades de relajación (señales muy anchas); para aquellos muy lejanos al metal, el efecto paramagnético es mínimo y las restricciones derivadas de los *pcs* no son significativas. El uso combinado de diferentes lantánidos elimina, en gran medida, la limitación intrínseca debida a la utilización de un único ion metálico<sup>249</sup>. La disponibilidad de diferentes celdas activas para los distintos lantánidos permite que los *pcs* sean operativos sobre toda la proteína (apartado 4.4 de la Introducción). Así comprobamos que la disminución en el *rmsd* que producen los *pcs* se hace patente sobre todo en regiones que en la estructura de partida estaban poco resueltas. Este efecto es drástico para el lazo III (sitio de coordinación del ion lantánido) y también patente en el caso del lazo II (el más alejado del centro paramagnético, Figura 17).



**Figura 78.** Valores de *rmsd* de los átomos del esqueleto por residuo utilizando todas las restricciones (círculos blancos) frente al *rmsd* de los mismos átomos cuando, en los cálculos, se utilizaban las restricciones diamagnéticas y: A) las *R1*; B) los *pcs*; C) los *rdc*; D) las restricciones metal-ligando (círculos negros).

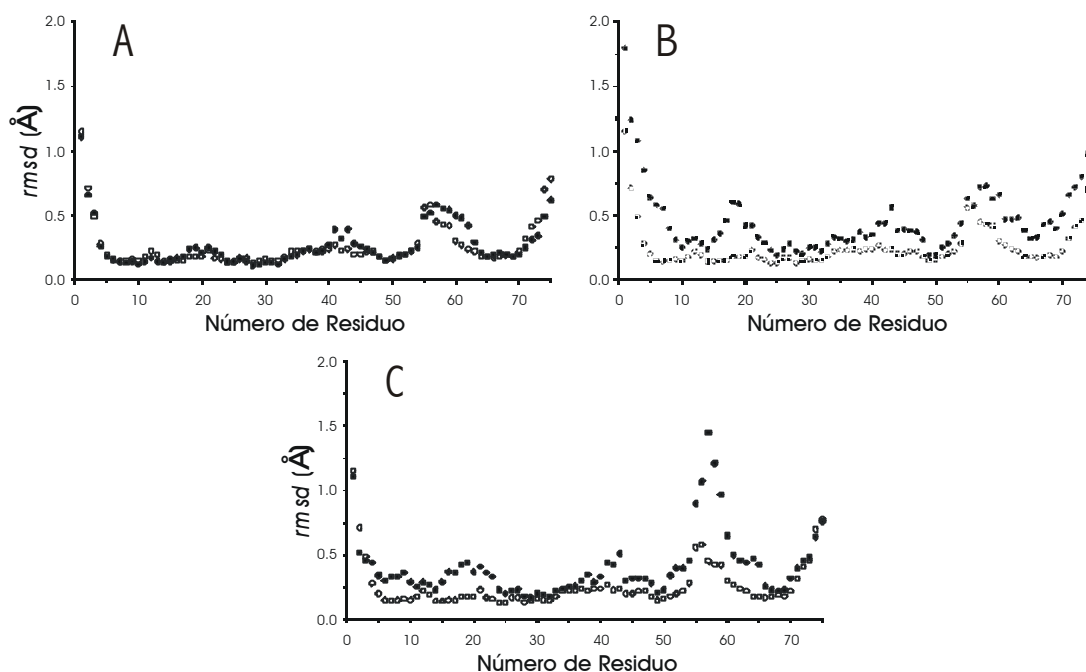
**Tabla 27.** Contribución de cada metal a la función diana de la totalidad de *pCS* en la estructura final.

<i>Metal</i>	<i>Contribución (%)</i>
Ce (N, HN)	8.2
Ce ( <sup>13</sup> C, <sup>1</sup> H alifáticos)	37.9
Dy	5.6
Er	0.0
Eu	1.7
Ho	10.2
Nd	3.3
Pr	10.1
Sm	9.7
Tb	5.8
Tm	1.0
Yb	6.5

Hemos realizado cálculos incluyendo sólo determinadas categorías de *pCS* (Figura 79). Los resultados de estos cálculos merecen ser reseñados. En la Figura 79-A se muestra el diagrama de los *rmsd* por residuo obtenidos cuando incluimos en los cálculos únicamente los *pCS* provenientes de nitrógenos y protones amida. Para las regiones en las que se dispone de un conjunto completo y consistente de *pCS* amídicos (Figura 79-A), todas, excepto la región del lazo III, donde se une el centro paramagnético, no se observa una mejora sustancial de la calidad de la estructura respecto a cuando se incluyen en los cálculos todos los *pCS*. En el lazo III, debido a la relajación, muchos nitrógenos y protones amida no se han detectado. Por este motivo, los *pCS* complementarios (los derivados de los protones y carbono-13 alifáticos) son fundamentales para aumentar la resolución de las estructuras de dicho lazo (Figura 79-A).

La exclusión de los cálculos de un grupo de restricciones *pCS* amídicas nos lleva a otra conclusión relevante: la estructura obtenida sin los *pCS* de corto alcance ( $\text{Ln} = \text{Ce}^{3+}, \text{Pr}^{3+}, \text{Nb}^{3+}, \text{Eu}^{3+}, \text{Sm}^{3+}$ , Figura 79-C) es globalmente peor que la estructura obtenida sin los *pCS* de medio y largo alcance ( $\text{Ln} = \text{Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}, \text{Tb}^{3+}, \text{Dy}^{3+}, \text{Ho}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ , Figura 79-B). A la misma conclusión se llega analizando los valores de los *rmsd* globales y de los porcentajes de las regiones de

Ramachandran para las estructuras obtenidas sin ambos grupos de restricciones (Tabla 26). Las estructuras obtenidas tras la exclusión de un determinado grupo de *pcs* amídicos muestran una menor resolución en diferentes zonas de la proteína (Figuras 79-B y C). La zona que más sufre la eliminación de los *pcs* de corto alcance es el segundo centro metálico, que muestra un máximo en el *rmsd* local de 1.2 Å (Figura 79-C). Como era previsible, la exclusión de los *pcs* de medio y largo alcance causa un efecto menor en el *rmsd* del lazo que coordina al ion lantánido (Figura 79-B).



**Figura 79.** Valores de *rmsd* de los átomos del esqueleto por residuo utilizando todas las restricciones (círculos blancos), frente al *rmsd* de los mismos átomos cuando, en los cálculos, se utilizaban todas las restricciones y: A) exclusivamente los *pcs* de los nitrógenos y protones amida; B) exclusivamente los *pcs* de corto alcance; C) los *pcs* de medio y largo alcance; (círculos negros).

### c) Restricciones derivadas de los acoplamientos dipolares residuales

En la Tabla 26 se observa el efecto de los *rdc* en la resolución de la estructura de Cb. Sin estas restricciones el *rmsd* global aumenta de 0.25 Å a 0.32 Å. Es importante resaltar que, aunque este incremento parece pequeño, estamos utilizando sólo 64 *rdc* frente a, por ejemplo, las 1700 restricciones *pcs* (Tabla 22). Por lo tanto, la contribución de los *rdc* es realmente destacable. Además, los *rdc* mejoran, en mayor medida que los *pcs*, la calidad de la representación de Ramachandran de la estructura (Tabla 26). Esto confirma que este tipo de restricciones, en general, así como las que provienen de una orientación inducida (en este caso por un centro paramagnético) son restricciones muy valiosas a la hora de definir la estructura global de la proteína.

---

En las Figuras 77-C y 78-C se observa cómo el efecto de los *rdc* está menos localizado que el de los *pcs*. Así, el *rmsd* global de la molécula aumenta cuando se eliminan las restricciones *rdc*, pero este incremento se reparte de manera bastante homogénea por toda la proteína (Figura 78-C). Además, se observa, también, que las regiones con estructura secundaria, como la hélice II, están mejor definidas. En esta región contamos con las restricciones debidas a los ángulos diedros. La contribución de los *rdc* a la resolución global de estos segmentos con estructura secundaria es menor que en los lazos. Es interesante remarcar que el efecto de los *rdc* afecta también a residuos para los que no se han obtenido los propios valores de *rdc*. Efectivamente, no hemos obtenido valores de *rdc* correspondientes a los residuos 55-62 (excepto para Val61), sin embargo, la exclusión de los 64 *rdc* causa un notable incremento en el *rmsd* local de esta región (Figura 78-C).

#### d) Restricciones derivadas de los ligandos del ion paramagnético

Debemos también comentar la contribución que aporta a la resolución de estructuras la identificación de los residuos enlazados al ion lantánido, obtenida mediante experimentos de detección directa de  $^{13}\text{C}^{220}$ . Los núcleos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , que experimentan desplazamiento hiperfino de contacto, deben pertenecer a residuos que estén coordinados al ion metálico. Por ello, hemos añadido unas restricciones de distancias máximas y mínimas a estos núcleos. Al ser restricciones derivadas de la coordinación del metal, reducen significativamente el *rmsd* local del lazo coordinante (Figura 4.8-D). Éste disminuye desde un máximo de 2.1 Å, sólo con restricciones diamagnéticas, a unos 1.5 Å. Podríamos decir que el efecto de estas restricciones es similar al de las de las  $R_1$ ; la única diferencia, como observamos en la Tabla 26, consiste en que las restricciones metal-ligando contribuyen también a una mejora general en la resolución de la estructura obtenida.

### 5.4. Complementariedad de las Restricciones Paramagnéticas

Si observamos los diagramas de *rmsd* por residuo para los protones del esqueleto de las familias de CaLnCb, obtenidas con diferentes grupos de restricciones (Figuras 78-B y 79), vemos un comportamiento del lazo que coordina el  $\text{Ca}^{2+}$  (lazo I) muy peculiar. Mientras la exclusión tanto de los *pcs* como de los *rdc* en los diferentes cálculos, nos lleva a un empeoramiento pequeño y comparable en la calidad de ambas estructuras en esa región (Figuras 77-B y C), la eliminación conjunta de ambos tipos de restricciones paramagnéticas en un mismo cálculo produce un drástico aumento del *rmsd* por residuo (Tabla 26). Esto demuestra una complementariedad muy útil entre las restricciones *pcs* y *rdc*. Debemos recordar que no existe información acerca de la coordinación del  $\text{Ca}^{2+}$  en el primer lazo. Esta región es un buen ejemplo de la escasez o, más bien, ausencia intrínseca de datos estructurales en una zona de la proteína silenciosa a la RMN de diamagnéticos.

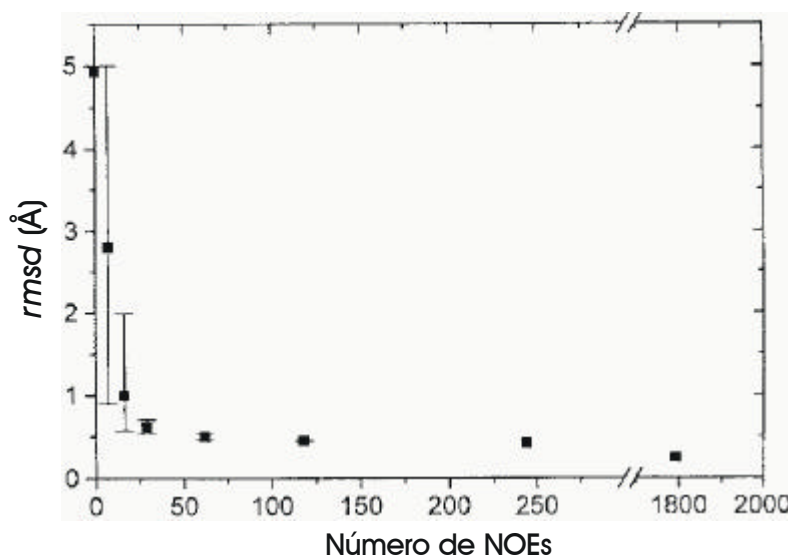
En la Tabla 26 se incluyen también los valores de los *rmsd* entre la estructura media obtenida con el grupo de restricciones indicado en cada caso y la estructura media final. La exclusión de un subgrupo de restricciones de los cálculos no sólo da lugar a una familia de estructuras con un *rmsd* mayor, sino que también lleva a una estructura media diferente de la obtenida con todas las restricciones. Esto significa que el conjunto de restricciones afecta, no sólo a la precisión de la estructura, sino también a la exactitud. Si la exactitud no se viera afectada, las estructuras medias obtenidas del cálculo con y sin restricciones deberían ser idénticas. Este análisis demuestra que las restricciones paramagnéticas son muy valiosas para el refinamiento del cálculo de estructuras, ya que presentan un cierto grado de complementariedad.

Normalmente, las estructuras que se obtienen de proteínas que poseen un centro metálico paramagnético presentan un *rmsd* local mayor para la zona donde está coordinado el ion. Este comportamiento depende del equilibrio existente entre la pérdida de información debida a la presencia del centro paramagnético y la información que este mismo centro produce. En este trabajo se muestra cómo las ventajas que el ion metálico proporciona superan a las desventajas. Esto se refleja en los valores de los *rmsd* locales (Figura 74). Pero, sobre todo, los datos aportados ponen de manifiesto que la información de los diferentes grupos de restricciones paramagnéticas produce un efecto sinérgico en la resolución de la estructura final de la proteína.

## **5.5. Relevancia de las Restricciones NOE**

Hemos estudiado la viabilidad de las restricciones paramagnéticas como sustitutas de las restricciones NOE. Para ello hemos realizado varios cálculos en los que se incluía todo el conjunto de restricciones paramagnéticas, mientras se iban eliminando, progresivamente, restricciones derivadas de los NOEs. En la Figura 80 se muestran los resultados obtenidos en estos cálculos.

En los cálculos que describimos a continuación no hemos eliminado las constantes derivadas de los ángulos diedros. Como hemos indicado anteriormente, los algoritmos matemáticos, en los que se basan los actuales programas de estructuras, requieren la definición de subestructuras secundarias (conexiones típicamente de corto/medio alcance,  $i-i+4$ , donde  $i$  representa el número de un aminoácido en la secuencia) para proceder a un posterior plegamiento global de la proteína. La eliminación de todas las restricciones de corto alcance produce siempre el colapso de las estructuras en mínimos locales no deseables. El hecho de mantener los ángulos diedros no desmerece nuestros cálculos, puesto que estos ángulos pueden obtenerse no sólo a partir de datos NOE, sino también a partir de constantes de acoplamiento. Además, el índice de desplazamiento químico<sup>448,449</sup> (*Chemical Shift Index*, CSI) proporciona también información de las estructuras secundarias presentes en cada dominio de una proteína.



**Figura 80.** Valores de *rmsd* de los átomos del esqueleto para estructuras obtenidas utilizando todas las restricciones paramagnéticas y diferente número de NOEs.

En el primer cálculo se eliminaron todos los NOEs, a excepción de los de largo alcance. Esto hizo disminuir el número de restricciones NOE de 1793 a 244. La familia resultante de este cálculo presentaba una función diana entre 0.8 y 1.1 Å<sup>2</sup>, notablemente menor que la de la familia de estructuras de referencia pero con un mayor valor de *rmsd* (0.41 frente a 0.25 Å). Los siguientes cálculos se realizaron eliminando al azar los NOEs de largo alcance. Las familias resultantes siguen teniendo valores pequeños de la función diana, mientras que los valores de *rmsd* aumentan a medida que se disminuye el número de NOEs (Figura 80). La calidad de la estructura, si tenemos en cuenta el *rmsd*, es aceptable incluso con un número de NOEs muy pequeño: el *rmsd* sigue siendo menor a 1.0 Å aun cuando se utilizan sólo 29 NOEs. Las barras de error de la representación de la Figura dan una idea de la variabilidad de resultados cuando se seleccionan diferentes conjuntos de NOEs al azar. Sin embargo, cuando eliminamos todos los NOEs del cálculo, el *rmsd* aumenta drásticamente hasta un valor de unos 5 Å, y la familia que obtenemos presenta sólo un vago plegamiento que recuerda al de la familia de alta resolución. Si elegimos los NOEs a incluir en el cálculo, los resultados mejoran mucho: así, tomando 7 NOEs pertenecientes a átomos de las cuatro hélices de la proteína, se obtiene una familia de estructuras con un *rmsd* de 0.91 Å. Este estudio corrobora el hecho de que sólo se necesitan unas pocas distancias para ubicar unas hélices respecto a otras. Hemos repetido este último cálculo, pero sin las restricciones derivadas del paramagnetismo. En este caso, el *rmsd* obtenido fue de 4 Å. Este alto valor da idea de la importancia que tienen las restricciones paramagnéticas al eliminar los NOEs.



El presente trabajo representa, entre otros, un primer paso hacia la determinación de estructuras mediante RMN sin NOEs.

## 6. Estudios de Desplegamiento Incipiente de la Calbindina D<sub>9k</sub>

En este trabajo hemos estudiado el proceso de desnaturalización del derivado monosustituido de cerio(III) de la calbindina D<sub>9k</sub> en sus primeros pasos. Para ello hemos caracterizado las propiedades dinámicas en presencia de cloruro de guanidinio a una concentración 2 M. En estas condiciones la proteína comienza a desplegarse. El objetivo de este trabajo es obtener información acerca de cómo y por qué residuos e interacciones se empieza a desnaturalizar la proteína. La determinación de los desplazamientos de pseudocontacto en este estado parcialmente desplegado nos ha servido para obtener diferencias estructurales entre la forma plegada y esta forma inicial de desplegamiento. Hemos obtenido, también, un modelo estructural de este estado desplegado usando como restricciones estos desplazamientos de pseudocontacto.

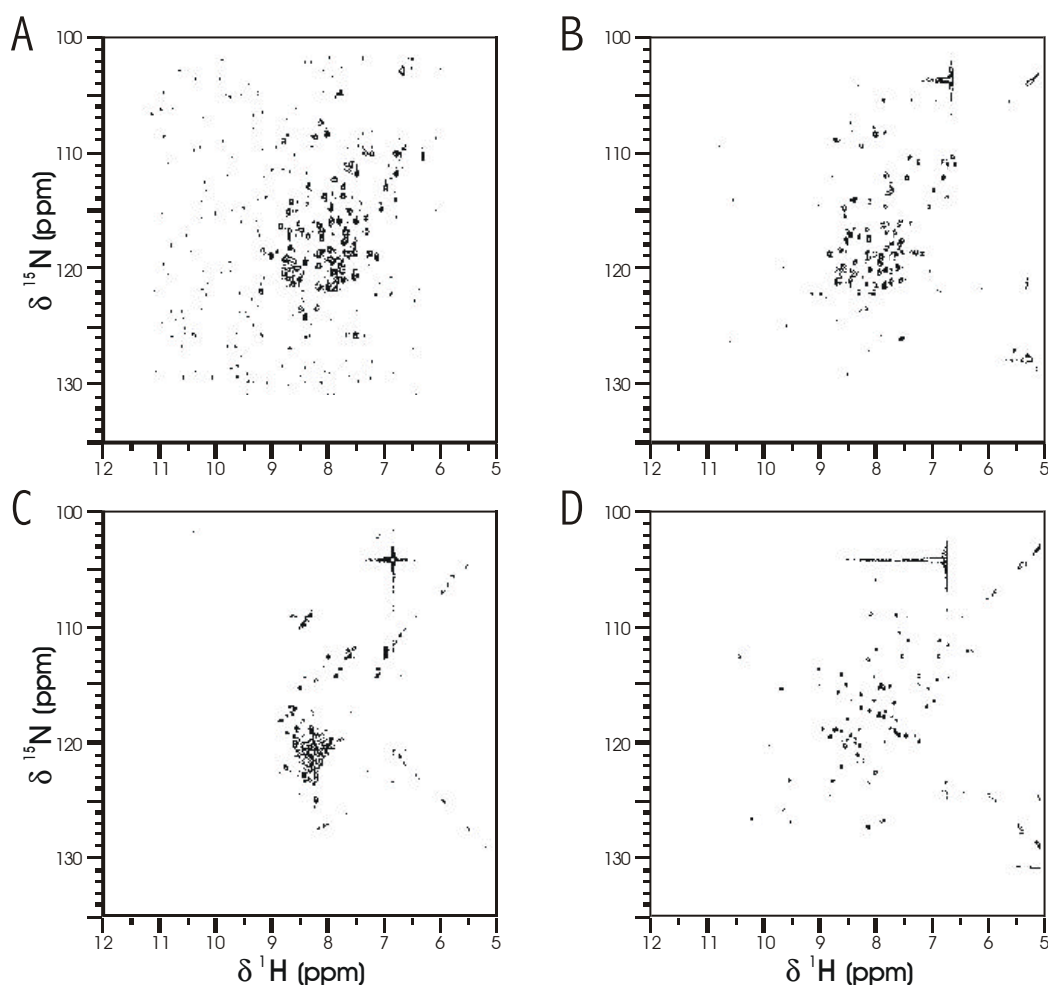
### 6.1. Valoración con Cloruro de Guanidinio

Hemos realizado una valoración con cloruro de guanidinio (GdmHCl) tanto de la proteína nativa, Ca<sub>2</sub>Cb, como del derivado metalado, CaCeCb, y también de la apo-Cb mediante experimentos homonucleares de protón (experimentos *watergate* y *superweft*) y heteronucleares (HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N) (apartados 2.1 y 2.2 de Materiales y Métodos).

En las muestras de Ca<sub>2</sub>Cb y CaCeCb adicionamos GdmHCl hasta una concentración de 5.5 M y no observamos pérdida de estructura secundaria a esa concentración de agente desnaturalizante. Por el contrario, cuando realizamos la valoración de una muestra de apo-Cb, observamos la pérdida total de estructura secundaria a una concentración de GdmHCl de 3.3 M. En la Figura 81 se muestra el espectro HSQC de apo-Cb a concentraciones de cloruro de guanidinio 0, 2.0 y 3.3 M.

Una vez desnaturalizada la apo-Cb, adicionamos calcio a la muestra hasta obtener una relación 2:1 ion metálico/proteína. El espectro <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC (Figura 81-D) registrado en estas condiciones

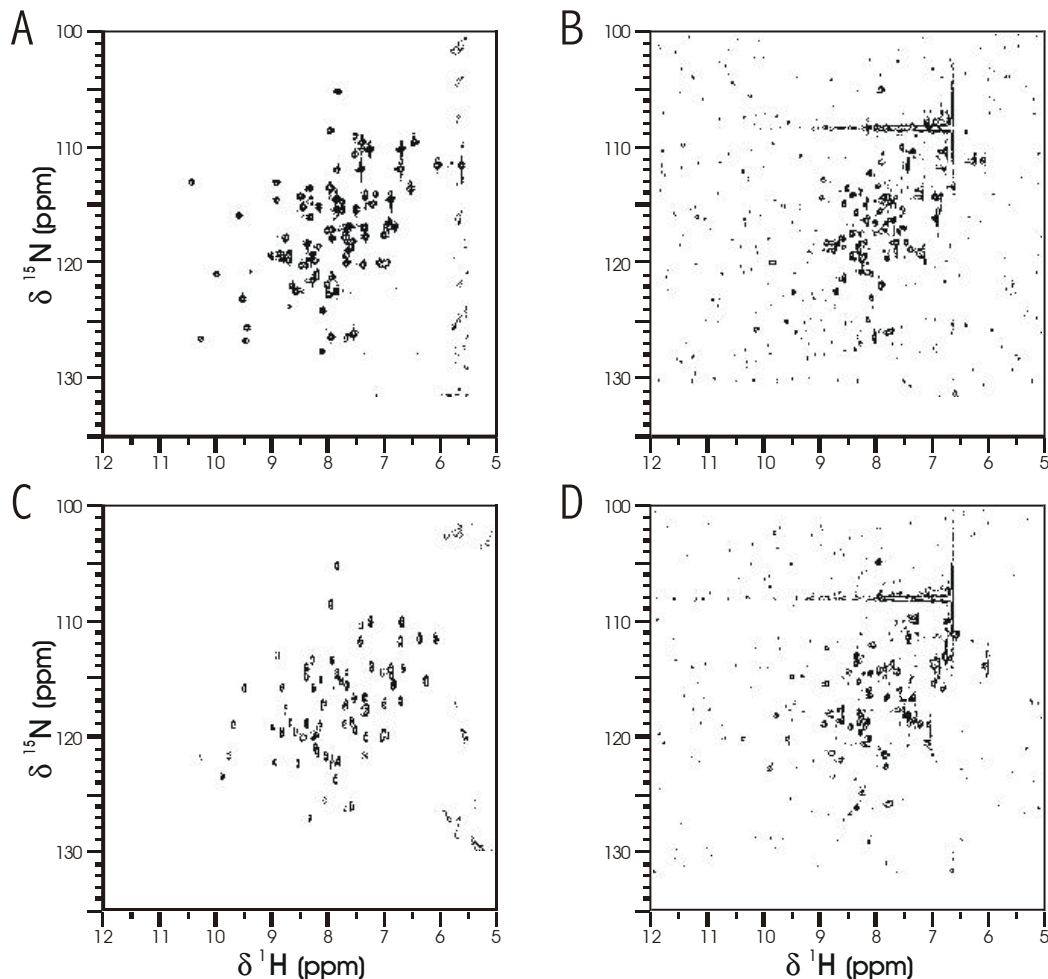
correspondía al de Ca<sub>2</sub>Cb en presencia de GdmHCl 3.3 M. En consecuencia, en presencia de un ion metálico la proteína se mantiene plegada hasta, al menos, una concentración de GdmHCl 5.5 M.



**Figura 81.** Espectros HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N de apo-Cb a concentraciones de GdmHCl: A) 0 M; B) 2 M; C) 3.5 M. D) Espectro HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N obtenido tras la adición de iones Ca<sup>2+</sup> a la muestra de apo-Cb desnaturalizada anterior. Este espectro coincide con el de Ca<sub>2</sub>Cb en presencia de GdmHCl 3.5 M.

En la Figura 82 se muestran los espectros HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N de Ca<sub>2</sub>Cb y CaCeCb en ausencia de agente desnaturalizante y en presencia de GdmHCl 2 M. Entre estas dos concentraciones las diferencias en los desplazamientos químicos de los protones amídicos, tanto para Ca<sub>2</sub>Cb como para CaCeCb, son pequeñas; algunas señales incluso no varían. La tendencia de los desplazamientos es muy parecida en ambos derivados metálicos. En el metaloderivado de Ce<sup>3+</sup> se observan cambios de

desplazamiento químico tanto en las señales diamagnéticas como en las que poseen desplazamiento hiperfino. Los cambios observados en el caso del  $^1\text{H}$  llegan hasta 2.0 ppm para las señales paramagnéticas y sólo hasta 0.3 ppm en el resto de resonancias (Figura 82). Para los núcleos de  $^{15}\text{N}$  las diferencias de desplazamiento causadas por el agente desnaturalizante eran inferiores a 1.0 ppm (Figura 82). Estas diferencias pueden estar relacionadas con algún mecanismo de dependencia de carga<sup>559,560</sup>.



**Figura 82.** Espectros HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de: A)  $\text{Ca}_2\text{Cb}$ ; B)  $\text{Ca}_2\text{Cb}$  en  $\text{GdmHCl}$  2 M; C)  $\text{CaCeCb}$ ; D)  $\text{CaCeCb}$  en  $\text{GdmHCl}$  2 M.

Se han realizado numerosos estudios de desplegamiento, mediante diversas técnicas espectroscópicas, tanto con la proteína nativa como con diferentes mutantes, siempre en la forma

metalada con calcio<sup>418,561,562</sup>. Según estos estudios la reducción de estabilidad del núcleo hidrofóbico no es suficiente, por sí misma, para inducir la apertura de la proteína, incluso cuando se imponen condiciones muy extremas de desnaturalización. Por lo tanto, mientras la proteína mantiene unidos los iones calcio, es extremadamente estable y conserva siempre su plegamiento. Las valoraciones que hemos realizado con GdmHCl nos permiten afirmar que, tanto los iones calcio(II) en la proteína nativa, como el ion cerio(III) en el derivado metalosustituido, desempeñan una función estructural (estabilizadora) en la proteína.

## 6.2. Estudios de Movilidad

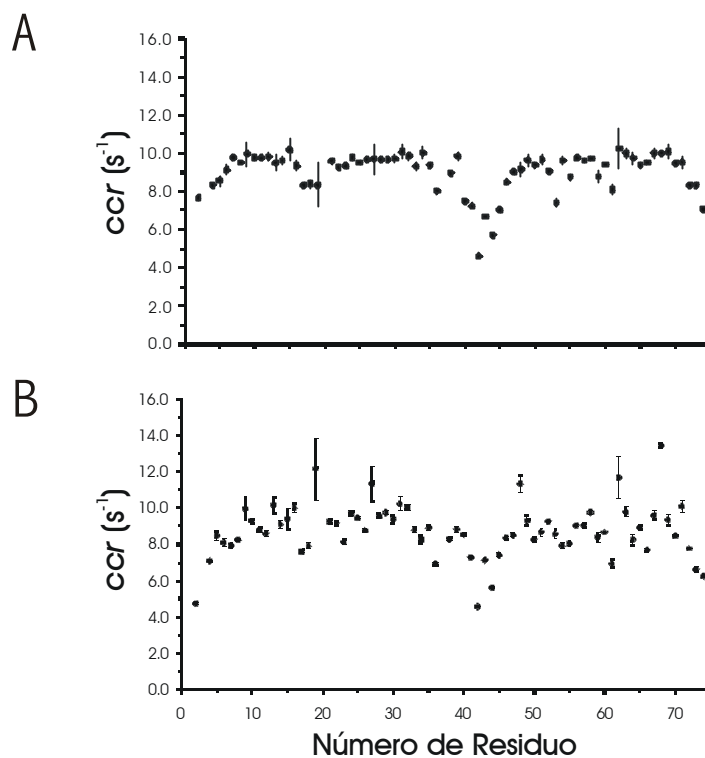
### a) *Dinámica rápida de Cb D<sub>9k</sub>*

Hemos realizado experimentos para la determinación de las velocidades de correlación cruzada *CSA*/dipolo-dipolo, *CCR*<sup>490</sup> (Capítulo 3 de Fundamentos Teóricos y 4 de Materiales y Métodos) en una muestra de Ca<sub>2</sub>Cb en GdmHCl 2 M. Los resultados obtenidos los hemos comparado con los de la proteína en ausencia de agente desnaturalizante<sup>563</sup>. Los valores obtenidos varían entre 4.6 y 10.2 s<sup>-1</sup> para Ca<sub>2</sub>Cb a concentración 0 M en GdmHCl y entre 4.6 y 13.4 s<sup>-1</sup> a 2 M de GdmHCl (Figura 83). Aunque el valor medio de *CCR* disminuye sólo un 5 % en presencia de agente desnaturalizante, hay aminoácidos que experimentan hasta un 25 % de variación. En la Figura 84 se muestran los residuos de Ca<sub>2</sub>Cb que experimentan una disminución de más de 0.6 s<sup>-1</sup> en su *CCR* comparando los valores obtenidos a las dos concentraciones de agente desnaturalizante.

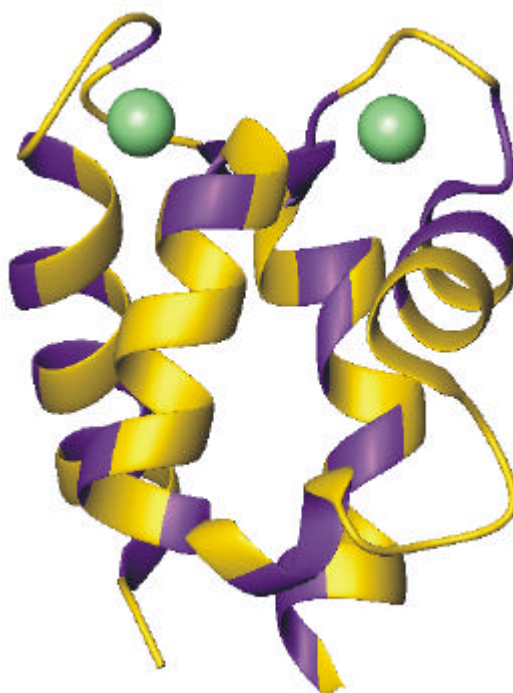
Como se observó en el estado plegado de la proteína<sup>563</sup>, los aminoácidos que presentan valores de *CCR* por debajo de la media, indicativo de movimientos rápidos (Capítulo 3 de Fundamentos Teóricos), forman parte de los lazos. En estado desplegado las *CCR* de los residuos de las hélices- $\alpha$  son ligeramente menores que en la proteína completamente plegada. Por el contrario, el intervalo de estos valores es mayor. En cada una de las manos-EF las dos hélices- $\alpha$  presentan un comportamiento diferente: así, las hélices- $\alpha$  I y IV están mucho más afectadas por la presencia de GdmHCl que las hélices- $\alpha$  II y III (Figura 84). Tampoco se comportan de la misma manera los dos sitios metálicos. De hecho, el lazo de la mano-EF regular (sitio II) parece estar mucho más afectado por la presencia de desnaturalizante que el de la pseudo-mano-EF (sitio I).

Es muy significativo el comportamiento de los residuos hidrofóbicos del núcleo. El núcleo hidrofóbico se forma por el empaquetamiento de las cadenas laterales de los residuos pertenecientes a las hélices- $\alpha$  y de los dos lazos coordinantes. Los estudios estructurales<sup>403</sup> ponen de manifiesto que el núcleo hidrofóbico está formado por los siguientes residuos: Leu6, Ile9, Phe10, Tyr13, Leu23, Leu28, Leu31, Leu32, Glu35, Leu46, Leu49, Phe50, Leu53, Val61, Phe66, Leu69,

Val70, e Ile73 (Figura 85). Algunos de los residuos hidrofóbicos que pertenecen a la hélice- $\alpha$  IV (Figura 84) experimentan una notable disminución de los valores de *CCR* con respecto a la proteína plegada. El análisis de la dinámica rápida de la proteína en medios 0 y 2 M de GdmHCl indica que los residuos externos de las hélices experimentan una disminución de las velocidades de correlación cruzada, mientras que la parte hidrofóbica de las hélices permanece prácticamente inalterada. Esto ratifica la imagen de que las interacciones hidrofóbicas, que tienen lugar entre las cadenas laterales de los distintos elementos de estructura secundaria, están dirigidas a reforzar el plegamiento empaquetado de las cuatro hélices- $\alpha$ .

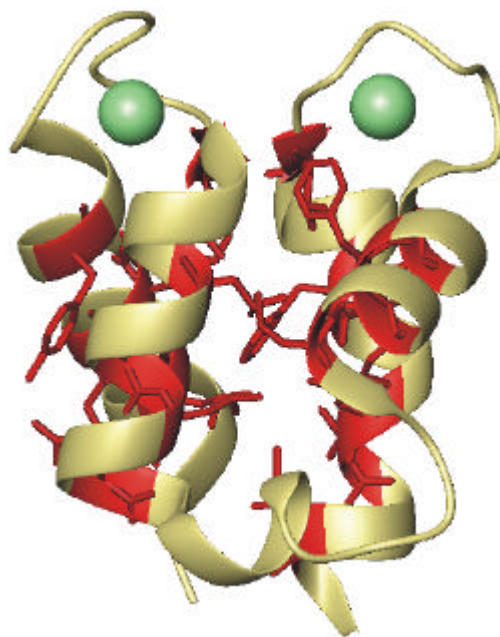


**Figura 83.** Velocidades de correlación cruzada de  $Ca_2Cb$ : A) en ausencia de GdmHCl<sup>563</sup>; B) en presencia de GdmHCl 2 M.



**Figura 84.** Estructura terciaria de la calbindina D<sub>9k</sub>. Los residuos destacados en violeta experimentan una variación en su velocidad de correlación cruzada mayor de 0.6 s<sup>-1</sup>.

Los residuos Leu23 y Val61 presentan las menores velocidades de correlación cruzada (Figura 83). Estos dos aminoácidos están ubicados en los sitios I y II, respectivamente, en la región de hoja- $\beta$  antiparalela. En el estado plegado, forman entre ellos dos puentes de hidrógeno interdominio. Como podemos observar en esta Figura 83, hay también algunos residuos cuyos valores de *CCR* aumentan con la adición de GdmHCl. Entre éstos, destacan: Asp19, Glu27, Glu48, Ser62 y Val68. Todos ellos, a excepción del Asp19 (cuyo oxígeno carbonílico actúa como ligante del ion calcio), están próximos en la secuencia a residuos que forman parte del núcleo hidrofóbico de la proteína. Estos residuos experimentan un aumento de rigidez no despreciable que puede estar relacionada con un empaquetamiento más estrecho y fuerte de las interacciones hidrofóbicas en la proteína como respuesta a la presencia de agentes desnaturizantes en disolución.



**Figura 85.** Estructura terciaria de la calbindina  $D_{9k}$ . En rojo se destacan las cadenas laterales de los aminoácidos que forman parte del núcleo hidrofóbico.

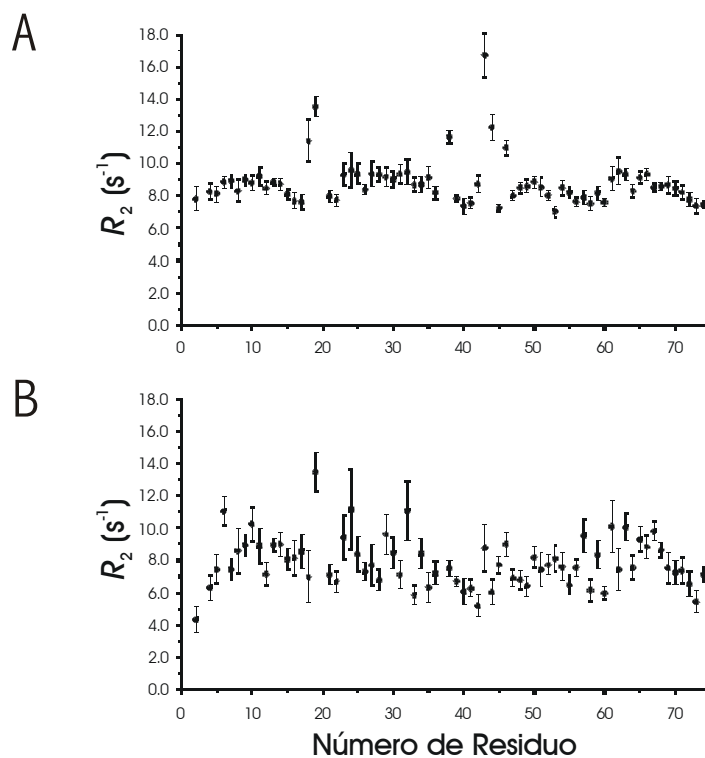
#### b) *Dinámica lenta de Cb $D_{9k}$*

Los movimientos de la proteína en las escalas de tiempo de micro- a milisegundos se deben normalmente a fenómenos conformacionales o de intercambio químico<sup>564</sup>. Esos procesos de intercambio contribuyen a la velocidad de relajación transversal y se pueden cuantificar, mediante medidas de relajación de  $^{15}\text{N}$  por RMN para las resonancias amida del esqueleto, utilizando los experimentos  $R_2$  CPMG a  $\tau_{cp}$  variable<sup>486,564</sup> (apartado 2.5 de Materiales y Métodos). Hemos medido los valores de  $R_2(1/\tau_{cp})$  para los núcleos de  $^{15}\text{N}$  en  $\text{Ca}_2\text{Cb}$  en presencia de GdmHCl 2 M. En ningún caso hemos observado dispersión alguna al representar los valores de  $R_2$  en función de  $1/\tau_{cp}$ .

En la Figura 86 se muestran los valores de  $R_2$  obtenidos para  $\tau_{cp} = 1\text{ ms}$  para  $\text{Ca}_2\text{Cb}$  en presencia de 2 M de GdmHCl (Figura 86-A) y los obtenidos previamente para la proteína nativa<sup>563</sup> (Figura 86-B). De la comparación de estas Figuras se pueden deducir dos conclusiones: i) la contribución de intercambio al  $R_2$ , observada en la forma nativa para los residuos Gly18, Ser38, Met43, Ser44 y Leu46, no está presente en la proteína parcialmente desnaturada; ii) el comportamiento de los valores de  $R_2$  en función de la secuencia de aminoácidos de  $\text{Ca}_2\text{Cb}$  en presencia de GdmHCl es muy parecido al que hemos observado para los valores de  $cCr$  (Figura 83). Con otras palabras, los residuos que pertenecen al núcleo hidrofóbico no se ven prácticamente



afectados por la presencia de agente desnaturante, mientras que los más expuestos al disolvente experimentan un aumento sustancial de los valores de las velocidades de relajación transversal de <sup>15</sup>N.

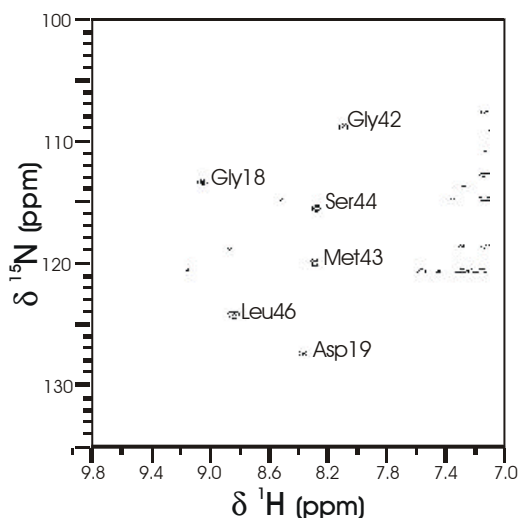


**Figura 86.** Valores de  $R_2(1/\tau_{cp})$  de los núcleos de <sup>15</sup>N en Ca<sub>2</sub>Cb: A) en ausencia de GdmHCl<sup>563</sup>; B) en presencia de GdmHCl 2 M.

Los experimentos  $R_2$  CPMG contribuyen a una mejor comprensión del comportamiento del sistema parcialmente desplegado. Por una parte, no se ha encontrado dependencia de los valores de  $R_2$  con el tiempo  $\tau_{cp}$ , hecho consistente con los resultados obtenidos para la forma plegada de la proteína<sup>563</sup>; por otra, los valores de  $R_2$  obtenidos para un valor fijo de  $\tau_{cp}$ , a 0 y 2 M de GdmHCl (Figura 86) indican que, a concentración 2 M de GdmHCl, no se produce la contribución de intercambio (dinámica en la escala de tiempo de milisegundos) observada en la proteína nativa para la mayoría de residuos del núcleo hidrofóbico. El único residuo que retiene la contribución de intercambio encontrada en la proteína plegada es Asp19. La dinámica lenta de este residuo está relacionada con la reorientación de la cadena lateral de Met43 (ver más adelante).

### c) Protones amida expuestos al disolvente

Con el objetivo de medir la velocidad de intercambio de los protones amida en la escala de tiempos superiores a segundos, hemos realizado un experimento *cleanex*<sup>506</sup> (apartado 2.7 de Materiales y Métodos) con la muestra Ca<sub>2</sub>Cb en GdmHCl. En este espectro (Figura 87) se observan diez señales que corresponden a los residuos Lys1, Ser2, Gly18, Asp19, Ser38, Gly42, Met43, Ser44, Leu46, Ser74. Estos residuos son los mismos que sufren intercambio químico en la calbindina sin agente desnaturante<sup>563</sup>. La ausencia de nuevos picos en el experimento *cleanex* indica que la adición de GdmHCl hasta 2 M no aumenta la exposición de residuos al disolvente. Estos datos son consistentes con la ausencia de cambios conformacionales (apartado anterior). En efecto, estos cambios suelen causar aperturas de ciertas zonas de la proteína que, de producirse, expondrían al disolvente sus protones amídicos. No es éste el presente escenario.



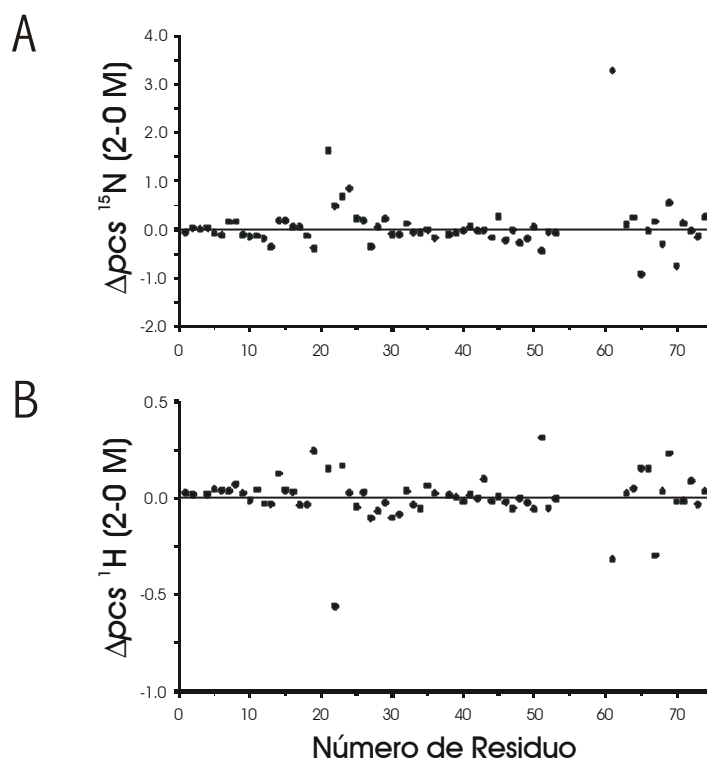
**Figura 87.** Experimento *cleanex* de Ca<sub>2</sub>Cb en presencia de GdmHCl 2 M.

## 6.3. Modelo Estructural de Cb D<sub>9k</sub> en GdmHCl 2 M

### a) Desplazamientos de pseudocontacto

A partir de los desplazamientos químicos de <sup>1</sup>H y de <sup>15</sup>N para Ca<sub>2</sub>Cb y CaCeCb a concentraciones 0 y 2M de GdmHCl (Figura 82), hemos obtenido los valores de *pcs* tanto para la proteína en estado plegado como en presencia de GdmHCl 2M. En la Figura 88 se muestran las diferencias que presentan los valores de *pcs* de CaCeCb en presencia y ausencia de agente

desnaturalizante. La tendencia general es la misma en ambas condiciones. Los aminoácidos que experimentan los cambios más acusados son los correspondientes a los lazos I y II. Siete residuos pertenecientes a los sitios metálicos (Asp19, Asn21, Gln22, Leu23, Ser24 del sitio I y Val61 y Glu64 del sitio II), así como dos pertenecientes al extremo C-terminal (Leu69 y Val70), presentan valores claramente distintos debido a la presencia de GdmHCl. Este cambio en los valores de  $\rho_{CS}$  en ambos lazos refleja la mayor movilidad de éstos en presencia de GdmHCl, como se ha comprobado mediante las medidas de  $CCR$ .



**Figura 88.** Diferencias entre los valores de  $\rho_{CS}$  de la calbindina a 0 y 2 M de GdmHCl de: A) núcleos de  $^{15}\text{N}$ ; B) protones amida.

Hemos introducido estos valores de  $\rho_{CS}$  en el programa FANTASIAN<sup>139</sup> (apartado 3.1 de Materiales y Métodos) para calcular la orientación de los ejes magnéticos y la magnitud de las componentes principales del tensor de susceptibilidad magnética. Los valores obtenidos fueron  $\Delta\chi_{ax} = 2.20 \times 10^{-32} \text{ m}^3$  y  $\Delta\chi_{rh} = 0.60 \times 10^{-32} \text{ m}^3$ , muy similares a los obtenidos para el estado nativo de CaCeCb ( $\Delta\chi_{ax} = 2.08 \times 10^{-32} \text{ m}^3$  y  $\Delta\chi_{rh} = 0.71 \times 10^{-32} \text{ m}^3$ )<sup>249</sup>.

---

Una vez calculado este tensor, es posible obtener un modelo de nuestro sistema en GdmHCl utilizando los *pcs* como restricciones estructurales (Capítulo 1 de Fundamentos Teóricos y 3 de Materiales y Métodos).

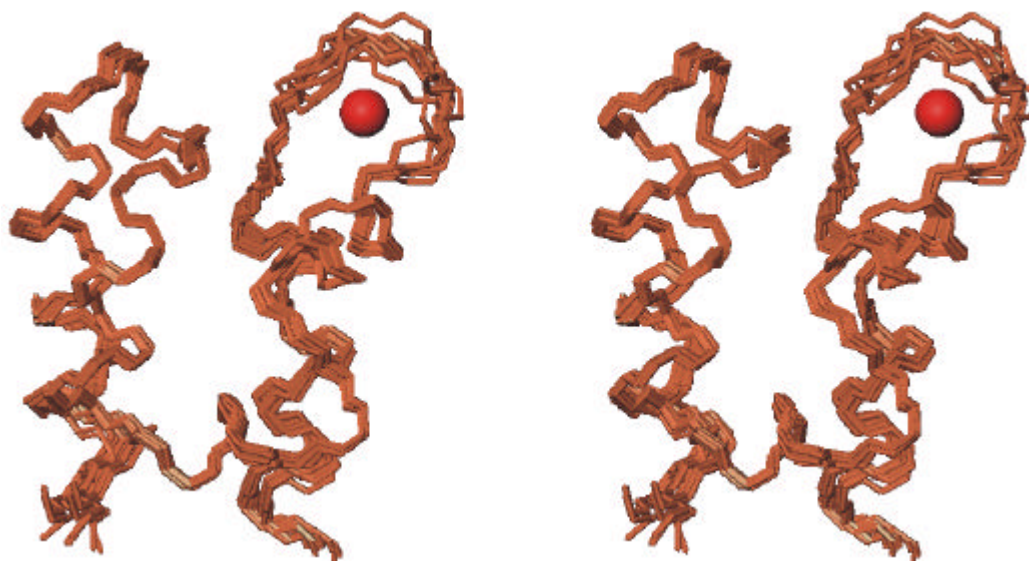
### b) Cálculo de estructuras

Para comprobar si los cambios dinámicos observados en la forma inicial desplegada de CaCeCb se reflejan en cambios estructurales, hemos determinado un modelo estructural de esta proteína en estas condiciones. Hemos realizado los consiguientes cálculos de estructuras con el programa PARAMAGNETIC-DYANA<sup>221</sup> (apartado 3.4 de Materiales y Métodos). Una forma rápida y eficaz de obtener información estructural en este sistema es el uso de las restricciones paramagnéticas, concretamente de los desplazamientos de pseudocontacto (apartado anterior). Estas restricciones se obtienen fácilmente y son muy sensibles a pequeños cambios conformacionales (Capítulo 5 de Resultados), por lo que su aplicación es inmediata. De esta forma se puede obtener un modelo estructural que nos ayude a contrastar los cambios dinámicos con posibles cambios conformacionales.

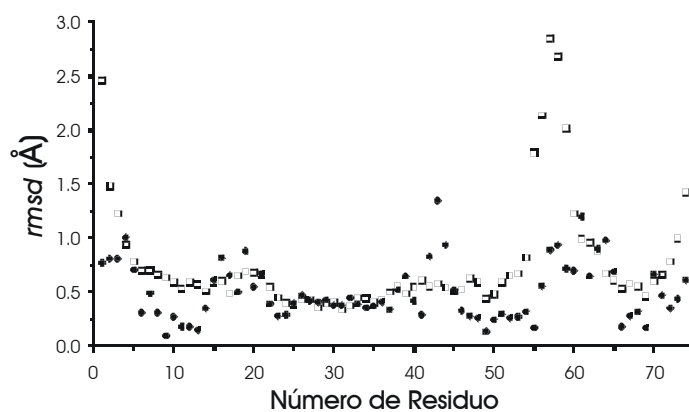
Como resultado de estos cálculos hemos obtenido veinte confórmeros que se muestran en la Figura 89. La función diana para todos ellos se encuentra en el intervalo de 1.10 a 1.15 Å<sup>2</sup>. La contribución mayoritaria a esta función proviene de los *pcs* (un 87 %), pero no se observa ninguna violación consistente entre las nuevas restricciones y los NOEs. Esta falta de violaciones consistentes indica que en los primeros pasos de la desnaturalización sólo se producen pequeños reajustes estructurales. La estructura obtenida está en proceso de depósito en el PDB con el nombre 1N65.pdb.

El *rmsd* para el esqueleto de las veinte estructuras obtenidas fue de  $0.71 \pm 0.23$  Å. La estructura de la calbindina D<sub>9k</sub> en estado plegado (Capítulo 5) consiste en cuatro hélices y tres lazos, de los cuales, el primero y el último forman los sitios de unión metálicos (Figura 17). La familia de estructuras que hemos obtenido presenta el mismo plegamiento global y las mismas estructuras secundarias que Ca<sub>2</sub>Cb en ausencia de agente desnaturalizante. No obstante, el valor medio del *rmsd* para los átomos del esqueleto entre las estructuras nativa y la aquí obtenida es de 0.48 Å, indicando cambios locales significativos. En la Figura 90 se representan los valores de *rmsd* por residuo entre las dos estructuras. En la Figura 91 se representa una superposición de la estructuras tridimensionales de CaCeCb en ausencia de GdmHCl (color violeta) y a una concentración de agente desnaturalizante de 2 M (color naranja). Se observa cómo, mientras los elementos de estructura secundaria y el plegamiento empaquetado de las cuatro hélices- $\alpha$ , no se ven afectados por la presencia de agente desnaturalizante, los dos lazos que ligan los iones metálicos y las regiones puente, experimentan variaciones estructurales significativas. Estas diferencias estructurales indican que los dos dominios (concretamente, los motivos mano-EF) experimentan algunos cambios

relativos en su orientación. Cabe destacar que el lazo III, que liga el ion metálico mediante cadenas laterales (Figuras 90 y 91), muestra reajustes estructurales más acusados que el lazo I, más rígido.



**Figura 89.** Vista estéreo de la familia de 20 conformeros obtenida para CaCeCb en presencia de GdmHCl 2 M. La esfera roja representa el ion cerio(III) (1N65.pdb).

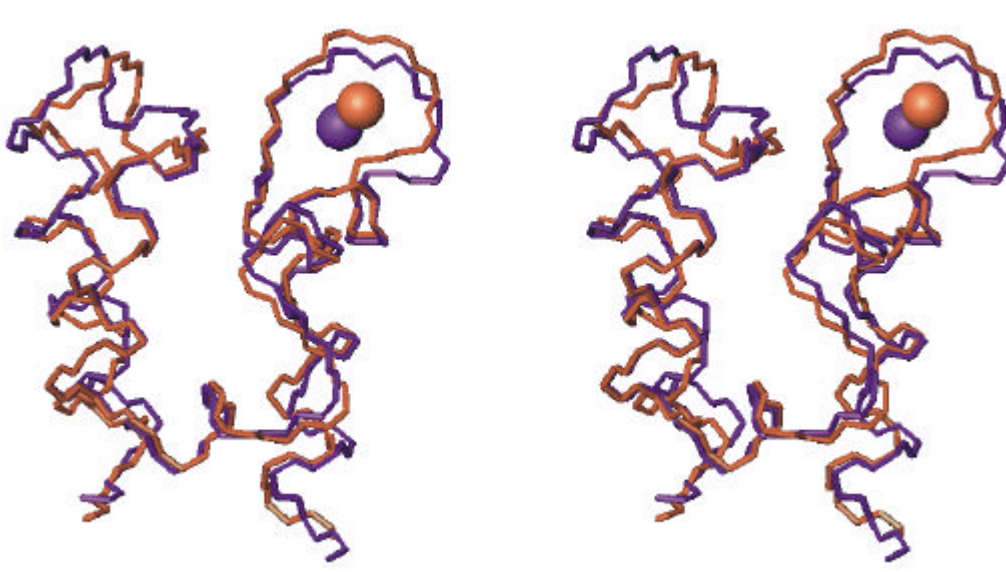


**Figura 90.** Valores de *rmsd* por residuo para los átomos del esqueleto para las estructuras de CaCeCb obtenida en ausencia de GdmHCl y la obtenida con una concentración 2 M de agente desnaturizante (círculos negros). Se muestra también la suma de los *rmsd* por residuo de ambas estructuras. Este parámetro se utiliza para mostrar las zonas que sufren mayor cambio estructural (cuadrados blancos).

## 6.4. Comparación de las Formas Plegada y Desplegada

### a) Reorientación de las manos-EF

La diferente topología de los lazos de la pseudomano-EF (lazo I) y de la mano-EF (lazo III) proporcionan a ambas subestructuras propiedades dinámicas diversas (Figura 83-B). Estudios previos de movilidad tanto en la proteína nativa como en diversos mutantes<sup>418,561-563</sup> han puesto de manifiesto estas diferencias en las características de ambos sitios metálicos. En las condiciones de nuestro estudio las divergencias se acentúan. Cuando la concentración de GdmHCl es 2 M, el lazo I conserva inalteradas sus propiedades dinámicas respecto al estado nativo (a excepción del residuo Asp19, que experimenta un aumento de rigidez). Esto sugiere que la dinámica del esqueleto está dirigida esencialmente por la unión del ion metálico y que concentraciones medias de agente desnaturante tienen sólo efectos pequeños en la afinidad de la pseudomano-EF por el  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, el sitio II de unión metálica (lazo III, Figura 17) experimenta una disminución de los valores de *CCR* más generalizada. Esto no es extraño, ya que la esfera de coordinación metálica está generada mayoritariamente por grupos carboxilato de las cadenas laterales, como ocurre en la mano-EF clásica. Así el esqueleto del sitio II de la calbindina está menos protegido por el ion metálico, es mucho más cromóforo-dependiente y, por lo tanto, está mucho más influenciado por elementos externos. Por todo ello, los residuos del lazo III presentan una mayor movilidad en presencia de un agente desnaturante.



**Figura 91.** Superposición de las estructuras de CaCeCb obtenidas en ausencia de GdmHCl (color violeta) y a una concentración de 2 M de agente desnaturante (color naranja).

Es interesante también comentar cómo afecta el comportamiento de los residuos hidrofóbicos a las hélices y, en consecuencia, a las dos manos-EF. No todos los residuos del núcleo hidrofóbico (Figura 85) se ven afectados de la misma manera por la presencia de cloruro de guanidinio. Mientras que para los residuos pertenecientes a las hélices- $\alpha$  I y III las diferencias observadas entre los valores de *ccr* a 0 y 2 M de GdmHCl se promedian a cero, los residuos hidrofóbicos de la hélice- $\alpha$  IV (Phe66, Leu69, Val70 e Ile73) experimentan cambios no despreciables (Figura 83). En apo-Cb y Ca<sub>2</sub>Cb se han observado diferencias estructurales precisamente en esta hélice- $\alpha$ <sup>416</sup> asociadas a una pequeña reorganización del núcleo hidrofóbico. Estos datos corroboran los nuestros y confirman que la región cercana a la hélice- $\alpha$  IV constituye la zona con interacciones más débiles en el núcleo hidrofóbico de la proteína.

### b) Metionina43

En el estudio de movilidad realizado en la proteína en estado plegado<sup>563</sup> se encontró un aumento del  $R_2$  para los residuos Gly18, Ser38, Met43, Ser44 y Leu46 con respecto al valor medio de las  $R_2$  de todos los núcleos <sup>15</sup>N de la calbindina. Esta mayor movilidad fue relacionada con la reorientación de la cadena lateral de Met43 hacia el centro de la proteína<sup>563</sup>. Hay que tener presente que en ese estudio, como en éste, se trabajó con el mutante Pro43Met de Cb D<sub>9k</sub>. Como hemos comentado en la Introducción, la calbindina nativa sufre isomería *cis-trans* debido a la presencia de esta prolina en el segundo lazo de la proteína. La introducción de esta metionina induce intercambios conformacionales en los residuos que pertenecen al núcleo hidrofóbico. De esta forma no sólo el residuo Met43, sino los aminoácidos cercanos a él se ven afectados por este cambio de posición de la cadena hidrofóbica.

En presencia de cloruro de guanidinio, agente desnaturizante que presenta carga, la conformación de la cadena lateral hidrofóbica de Met43 expuesta hacia el exterior, se ve desfavorecida por el aumento de polaridad de la disolución. Así, el GdmHCl tiende a congelar el intercambio conformacional de la cadena hidrofóbica de Met43 y el de los residuos Gly18, Ser38, Ser44 y Leu46. En nuestro trabajo se confirma esta disminución de intercambio conformacional tanto con los resultados obtenidos para la movilidad lenta ( $R_2$  CPMG) como con la movilidad rápida. En efecto, los valores de *ccr* para Met43 en Ca<sub>2</sub>Cb a 2 M de GdmHCl muestran una disminución de la movilidad. Esto sugiere la reorientación de la cadena lateral hacia el núcleo de la proteína. Además, en la familia de estructuras que hemos obtenido para la calbindina parcialmente desnaturizada, las diferencias más notables con respecto a la proteína en estado nativo tienen lugar precisamente en la zona del lazo II, donde se encuentra Met43 (Figura 17). Así pues, los resultados estructurales apoyan la hipótesis de la reorientación de la cadena lateral de este residuo. Esta nueva conformación minimiza la interacción entre la cadena lateral hidrofóbica y el agente desnaturizante cargado.

*c) Puente de hidrógeno Leu23-Val61*

La disminución de los valores de *CCR* observada en dos residuos que participan en un doble puente de hidrógeno de largo alcance (residuos Leu23 y Val61) sugiere que, aún a bajas concentraciones de GdmHCl, pueden existir variaciones estructurales en la posición relativa de los dos dominios de la proteína. El aumento de movilidad de los aminoácidos Leu23 y Val61 está relacionado con la ruptura del puente de hidrógeno que, por otra parte, tiene un papel esencial en la posición relativa de las dos manos-EF. Estos reajustes estructurales, supuestos a partir de los resultados de *CCR*, vienen confirmados en nuestro modelo estructural, puesto que sólo tres conformeros, de la familia de veinte obtenida, conservan este doble puente de hidrógeno. Esta reorganización local afecta ligeramente a la totalidad de la superficie de la proteína. Consecuencia de estos cambios es la sutil reorientación observada en el tensor de anisotropía magnética del metal.



## V. Summary



# Application of the Nuclear Magnetic Resonance of Paramagnetic Systems to the Determination of Structural and Dynamic Properties of the Proteins Rusticyanin and Calbindin D<sub>9k</sub>

This is a brief summary of the present Ph. D. Thesis.

## 1. Objectives

The first step to comprehend how proteins work is the knowledge of their structure. A second further step is determining their mobility features. NMR is the only methodology that allows the procurement of detailed, high quality information of biomolecules in solution at atomic level. NMR permits, as well, the complete dynamic characterization of a protein, and the acquaintance of its hydration properties.

When working with NMR, substantial advantages can be derived from the existence of paramagnetic ions. The presence of unpaired electrons in a molecule changes the NMR parameters of its resonating nuclei. The paramagnetism provides essential structural information not only from the metal site surroundings, but also from the whole protein.

This PhD Thesis represents an exhaustive example of this last statement. Two different and complementary aims were pursued and reached in this Thesis. The first one was methodological. We apply NMR to paramagnetic systems in order to obtain information on the electronic properties of the metal, on the structure of the whole systems, and also on its dynamic features. The second one was strictly biochemical. We have characterised the blue copper protein rusticyanin and the calcium binding protein calbindin D<sub>9k</sub> by paramagnetic NMR and we have correlated structural and dynamic aspects of each protein with their functional properties.

## 2. Systems of Study

As just specified, we have worked with two systems in this Thesis: rusticyanin (Rc) and calbindin D<sub>9k</sub> (Cb). A brief explanation of the function of these two proteins, as well as the concrete studies that we have performed with them follows.

### 2.1. Rusticyanin

Rusticyanin is a blue copper protein (BCP) isolated from the gram-negative bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. BCPs are small (12-18 kDa) soluble proteins exhibiting a typical  $\beta$ -barrel fold. They have a type 1 copper center, with a cysteine, two histidines and an axial ligand methionine coordinated to the copper ion. They are involved in electron transfer processes. Rc contains 155 aminoacids and is the BCP with the highest redox potential. It is also very stable in acid media ( $\text{pH} < 2$ ).

We have performed four different studies with this protein. Each of them is a Chapter of the present Thesis and is briefly summarized below. These Chapters are:

- *<sup>1</sup>H NMR Studies on Cobalt(II)Rusticyanin.*
- *Studies on Copper(II)Rusticyanin at 800 MHz.*
- *Axial Ligand Mutants of Rusticyanin.*
- *Dynamics and Hydration of Rusticyanin.*

### 2.2. Calbindin D<sub>9k</sub>

Calbindin D<sub>9k</sub> (Cb) is a calcium binding protein, predominantly found in the epithelial cells of the small intestine and placenta. Cb is a small (75 residues) monomeric protein implicated in calcium transport. It consists of two helix-loop-helix EF-hand motifs and it binds one calcium ion with each loop (two ions per molecule). The calcium ion in the second binding site can be substituted with lanthanides.

We have performed two different studies with Cb D<sub>9k</sub>:

- *CaCeCb Structure: Relevance of Paramagnetic Constraints.*
- *Early Steps of Unfolding of Calbindin D<sub>9k</sub>.*

In the following Table we described the articles (and the state of them) corresponding to each Chapter. The published articles are enclosed at the end of this memory (VIII. Artículos).

Chapter	Publication
4.1. <i><sup>1</sup>H NMR Studies on Cobalt(II) Rusticyanin.</i>	<i>Biochemistry</i> , <b>2001</b> , 40, 837-846.
4.2. <i>Studies on Copper(II) Rusticyanin at 800 MHz.</i>	<i>J. Am. Chem. Soc.</i> , <b>2002</b> , 124, 13698-13708.
4.3. <i>Axial Ligand Mutants of Rusticyanin.</i>	Manuscript in preparation
4.4. <i>Dynamics and Hydration of Rusticyanin.<sup>a</sup></i>	<i>Biochemistry</i> , <b>2003</b> , 42, 10396-10405. Chapter of the Book: <i>Methods in Proteome and Protein Analysis</i> ; Kamp, R.M., Calvete, J., Choli-Papadopoulou, T., Eds.; Springer-Verlag; <i>in press</i> 2004, pp 15-33.
4.5. <i>CaCeCb Structure: Relevance of Paramagnetic Constraints.</i>	<i>Journal of Biomolecular NMR</i> , <b>2001</b> , 21, 85-98.
4.6. <i>Early Steps of Unfolding of Calbindin D<sub>9k</sub>.</i>	<i>Biochemistry</i> , <b>2003</b> , 42, 13066-13073.

<sup>a</sup> From this Thesis Chapter, an article and a chapter of a book have been written. The chapter of the book is entirely methodological, while the results are described in the published manuscript.

### 3. Methodology

We have mainly used two kind of techniques:

- Biochemical techniques.
- Nuclear Magnetic Resonance.

#### 3.1. Biochemical Techniques

##### a) *Rusticyanin studies*

*Escherichia coli* with the plasmid of rusticyanin was provided by Professor Samar S. Hasnain (CCLRC Daresbury Laboratory, UK) and Dr. John F. Hall (De Monfort University, Leicester, UK). *E. coli* was grown in LB and M9 culture media in our Laboratory of the University of Valencia. In this way, we obtained the no labelled protein, and Rc single labelled with  $^{15}\text{N}$  or double labelled with  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ . Purification of the protein was carried out by standard biochemical methods. We have also obtained the cobalt(II) derivative of Rc, CoRc.

Mutants in the axial ligand of Rc were prepared by Dr. J.F. Hall during an attendance of Mrs. Jiménez to the De Monfort University (March, 2002). During this stage she has also got the expertise to operate with some cloning routines.

##### b) *Calbindin $D_{9k}$ studies*

Cb studies were performed in the Magnetic Resonance Center (CERM) from the University of Florence during the two stages that Mrs. Beatriz Jiménez performed in this Laboratory (October, 2000-January, 2001; August, 2001-February, 2002). Protein culture and purification had been previously carried out there. All the samples for the unfolding studies of Cb were prepared by the author of this Thesis during her second stage in the Italian laboratory.

#### 3.2. Nuclear Magnetic Resonance

A vast number of different homonuclear and heteronuclear ( $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$ ) NMR experiments have been performed throughout the Thesis work. Both kind of experiments were also carried out in slow (for diamagnetic experiments) or fast (for paramagnetic experiments) acquiring conditions. These experiments have allowed us the assignment of the signals of interest, the procurement of the constraints for NMR structure calculations and the measurement of relaxation data for dynamic studies.

## 4. Results and Conclusions

### 4.1. *<sup>1</sup>H NMR Studies on Cobalt(II)Rusticyanin*

We have characterized the electronic structure of the cobalt(II) derivative of Rc by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. Co(II) is a very adequate probe to study copper proteins because its fast electronic relaxation rates provide <sup>1</sup>H NMR signals sufficiently sharp to be assigned. Due to the large magnetic anisotropy of this metal ion the NMR spectra of cobalt(II)-substituted BCPs display a wide dispersion of the signals. Hence, substantial structural information is extracted not only on the metal ion coordination sphere, but also on residues located as far as 9 Å from the cobalt.

We have assigned all the hyperfine shifted protons in Co(II)Rc by using 1D steady-state NOEs and two-dimensional NMR experiments. We have calculated the orientation of the magnetic susceptibility tensor for this derivative as well as the axial, and rhombic magnetic susceptibility anisotropy components. We have also quantify the contact and pseudocontact contribution to the hyperfine shifts for the metal ligands. We have compared our results with those previously reported for cobalt substituted azurin, CoAz (also performed by our group), and with <sup>1</sup>H NMR spectra from other cobalt-substituted proteins. This work has allowed us to obtain a detail picture of metal surroundings in Rc.

### **Conclusions**

- Paramagnetic NMR is able to reveal subtle differences that are not evident by other techniques. The conformation of the Ile140 side chain in solution is not the same as described by X-Ray diffraction in solid state or diamagnetic NMR in solution. This isoleucine is the main residue (the closest one) in providing the metal ion its hydrophobic environment.
- The strength of the metal ion-axial ligand interaction is very different in CoAz and CoRc. Nevertheless, the magnetic susceptibility for both cobalt derivatives is quite similar. Thus, the metal-axial ligand covalence does not determine the electronic structure of the metal ion.
- CoRc and cobalt substituted pseudoazurin (PsAz) have very similar metal-axial ligand interactions and electronic structures. The redox potentials of Rc and PsAz differ by more than 300 mV. Hence, electronic structure is not the main factor in determining the redox potential for Rc.
- The majority of protons presenting pseudocontact shifts belong to hydrophobic residues. Thus, these hydrophobic residues are affected by the effect of the unpaired electrons. In turn, the hydrophobic residues affect the metal ion, stabilizing the reduced form. The hydrophobic

environment of the metal ion is probably the main factor determining the high redox potential of Rc.

#### 4.2. Studies on Copper(II)Rusticyanin at 800 MHz

The slow electronic relaxation rates of the copper(II) ion had prevented the study of these systems by  $^1\text{H}$  NMR until few years ago. Nowadays, the combined use of exchange spectroscopy and high magnetic fields (as large as 18.8 T) has permitted the assignment of the  $^1\text{H}$  NMR spectrum in oxidised, copper(II), proteins such as plastocyanin, azurin, and stellacyanin.

We have assigned all the hyperfine shifted signals in the Cu(II)Rc  $^1\text{H}$  NMR spectrum. This includes signals that are not directly observed. In fact, the resonances belonging to the  $\text{H}\beta$  of Cys138, one of the copper ligands, and an HN amide hydrogen bonded to the  $\text{S}\gamma\text{Cys}$  atom are extremely wide (the line broadening of these signals are larger than  $2.0 \times 10^5$  Hz). They have been detected and assigned by the so-called “blind NOE” experiment. From our results and from those obtained with other BCPs, we have related structural parameters of the copper geometry in BCPs with the covalence of the Cu- $\text{S}\gamma\text{Cys}$  moiety. This bond is essential in keeping the thermodynamic and spectroscopic features of BCPs.

### Conclusions

- The electronic structure of the copper ion in blue sites is defined by the orientation of the histidine ligands, that, in turn, are spatially disposed according to its interaction with the copper ion.
- The interaction of the copper ion with Cys and Met ligands is independently determined by the protein folding around the metal site. Hence, the Cu- $\text{S}\gamma\text{Cys}$  interaction in BCPs and their spectroscopic features are directly dependent on how the copper ion can be oriented into the secondary elements of the protein.
- The Cu- $\text{S}\gamma\text{Cys}$  interaction is not a relevant factor determining the redox potential. Moreover, Rc, the BCP with the highest redox potential, also has the weakest Cu- $\text{S}\gamma\text{Cys}$  interaction among all these proteins. This fact is, in principle, contrary to the general accepted hypothesis (a stronger copper- $\text{S}\gamma\text{Cys}$  interaction would give a higher redox potential).



### 4.3. Axial Ligand Mutants of Rusticyanin

The axial ligand of the copper ion in BCPs, typically a methionine, modulates the strength of the interaction between the copper and the sulphur of the cysteine in BCPs. This last interaction is responsible for the spectroscopic and, presumably, thermodynamic properties of the BCPs. Hence, these properties are indirectly controlled by the axial methionine.

We have characterized the active site of five mutants of rusticyanin in the axial ligand, Met148, in its oxidised form. In these mutants, Met148 has been replaced with Gln, Glu, Cys, Leu and Lys. We have assigned the hyperfine shifted signals by using exchange NMR spectroscopy.

#### **Conclusions**

- The Met148Gln Rc mutant is very similar to the native Rc. The copper-axial ligand interaction is stronger in this mutant than in the wild type. This confers a more tetrahedral geometry to the metal ion as well as a lower degree of covalence to the copper-S $\gamma$ Cys interaction. Studies performed on the cobalt(II) derivative of this mutant confirms this point.
- In the Met148Glu Rc mutant the interaction of the copper with the cysteine ligand is lower than in the wild type. This lower interaction Cu-S $\gamma$ Cys is related with a high degree of covalence between the metal and the axial ligand. The copper ion is typically tetrahedral in this mutant.
- The Cu-S $\gamma$ Cys interaction in the Met148Leu Rc mutant is the strongest of all these systems. The copper in the Met148Leu mutant presents a trigonal planar geometry because Leu148 does not coordinate the metal ion.
- A similar situation to the last one could be found for Met148Lys Rc.

#### 4.4. Dynamics and Hydration of Rusticyanin

NMR provides information on the time scale (from pico- to milliseconds) of the mobility of a protein. Location of solvent molecules can also be detected by NMR. We have performed dynamic studies in copper rusticyanin in both redox states. We have also explored the exposition of the different domains of the protein to the solvent. These studies have been performed by heteronuclear,  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ , NMR spectroscopy.

We have determined the longitudinal and transversal relaxation rates of  $^{15}\text{N}$  nuclei, and the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NOE values for the backbone nuclei in the reduced state, Cu(I)Rc. The results have been analysed by applying the model-free approach. We have determined the cross-correlation rates between the chemical shift anisotropy of the  $^{15}\text{N}$  nuclei and the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  dipole-dipole relaxation for both Cu(I)Rc and Cu(II)Rc. Solvent accessibility has been studied determining the  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  exchange rates of the amide protons. Finally, specific heteronuclear experiments ( $^{15}\text{N}$ -(CLEANEX-PM)-FHSQC and ePHOGSY experiments) have been employed to determine amide proton in exchange with the bulk solvent, and with water molecules residing in the protein for a time longer than the correlation time (probably structural or functional water molecules).

### Conclusions

- Rc is the most rigid BCP. This holds not only within the  $\beta$ -barrel scaffold but also in the loop regions.
- These features are independent of the redox state of the metal ion.
- Percentage of residues hidden to the solvent is higher in Rc than in other BCPs.
- The N-35 N-terminal extension (a characteristic region of Rc not present in the rest of BCPs) behaves as an additional domain which plays an important role to shield the  $\beta$ -barrel core from the solvent exposure.

#### 4.5. CaCeCb Structure: Relevance of the Paramagnetic Constraints

The two chapters dedicated to the calcium binding protein calbindin D<sub>9k</sub> were performed at the Magnetic Resonance Center (CERM) of the University of Florence (Italy) during the two stages that Mrs. Beatriz Jiménez performed in this Laboratory.

We have investigated the effect of the paramagnetism-based constraints (nuclear relaxation rates, pseudocontact shifts, and residual dipolar couplings) in solution structure determination. The mono-substituted Ce(III) calbindin D<sub>9k</sub>, CaCeCb, has been our system of study.

We have performed an extensive number of experiments in order to: i) assign the protein nuclei (HNCO, HNCA, <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C COSY, HCCH-TOCSY, among others); ii) obtain restraints for the structure calculation (Inversion-Recovery HSQC, HNCO to determine H-bonds, HNHA, *J*-modulated HSQC, etc.). The calculated structure was based in 3880 constraints from very different sources. Paramagnetic versus diamagnetic based constraints were confronted and the relative weight of each restriction to the refinement of the structure was quantified. This comparison was performed both in terms of increasing the resolution (lowering the *rmsd*), and in terms of consistency among all the used restraints (no increase of the target function). An study about the crucial NOEs required to produce a correct folding of the protein in the calculated structures was also performed. For doing this, we carried out several runs in which NOE restraints were selectively removed.

### Conclusions

- We have calculated an NMR structure of Cb D<sub>9k</sub> with a very high degree of resolution. This is true not only in regions far away from the metal ion, but also in the proximity of it.
- The degree of refinement depends on the balance between two opposite contributions of the metal center: on one hand, the loss of information due to the fast relaxation; on the other hand, the gain of information that provides the paramagnetic center, because some NMR parameters are structurally dependent on it.
- The paramagnetism-based constraints show good complementarity with the diamagnetic ones.
- The paramagnetism-based constraints alone produce an unresolved structure. But, the concomitant use of paramagnetism-based constraints, angular constraints (short range constraints) and a very few selected NOEs provides a calculated structure with the correct folding and a very high resolution.

#### 4.6. Early Steps of Unfolding of Calbindin D<sub>9k</sub>

We have monitored the unfolding of the calbindin D<sub>9k</sub> by <sup>1</sup>H and heteronuclear NMR. With this propose, we have determined the dynamic features of the protein in presence of guanidinium chloride (GdmHCl) 2 M. Pseudocontact shifts of CaCeCb in this conditions were used to solve a structural model of the incipient unfolded protein. In order to ascertain the role of the metal ion in the protein stability, GdmHCl titrations of apo-Cb, Ca<sub>2</sub>Cb, and CaCeCb derivatives were also performed.

The residues which undergo mobility in the pico- to nanosecond time scale were identify by measuring cross correlation rates, while those presenting motions in the micro/millisecond time scale were characterized by specific heteronuclear experiments (transversal relaxation rates as a function of the  $\tau_{cp}$  delay in the CPMG pulse sequence). Fast amide proton exchange rates were also measured in the 2 M GdmHCl Ca<sub>2</sub>Cb sample.

### Conclusions

- Apo-Cb unfolds at a GdmHCl concentration of 3.3 M. The other derivatives (native and cerium substituted Cb) stay folded up to GdmHCl 5.5 M. Metal ions are essential in Cb folding stability.
- The two metal binding domains have a different behavior under mild denaturing conditions (2 M GdmHCl). The calcium binding site retains unaltered the dynamic properties of the folded state at GdmHCl 2 M, while the cerium binding site experiences a more generalized increase in its mobility.
- The hydrophobic core of the protein shows a tighter packing at GdmHCl 2 M. Within this hydrophobic core, residues belonging to helix IV are much more affected than residues from helices I-III.
- The calculated model structure, based in pseudocontact shifts, shows the same overall folding for CaCeCb at GdmHCl 2 M and in absence of denaturing agent. The disruption of a double interdomain hydrogen bond between Leu23 and Val61 (present in the native state) is probably related with some minor changes in the relative orientation of EF-hands.

## VI. Conclusiones



1. La RMN aplicada a sistemas paramagnéticos pone de manifiesto sutiles diferencias estructurales, no evidentes mediante otras técnicas. Constituyen ejemplos de esta afirmación: la observación del entorno altamente hidrofóbico del metal en cobalto rusticianina y de los cambios conformacionales de las cadenas laterales de Ile140 en rusticianina y de Met43 en calbindina D<sub>9k</sub>.
2. El paramagnetismo en RMN proporciona datos estructurales (derivados de las velocidades de relajación, de los desplazamientos de pseudocontacto y de los acoplamientos dipolares residuales) que compensan y superan la pérdida de información por relajación. La alta resolución de las estructuras de calbindina D<sub>9k</sub> tanto en estado nativo como en estado desplegado incipiente es buena muestra de ello.
3. Las restricciones paramagnéticas pueden ser una de las puertas que abra paso al cálculo estructural en disolución en ausencia de NOEs.
4. La estructura electrónica del ion cobre en los centros azules está definida por su orientación respecto a los ligandos histidina. La interacción del cobre con los ligandos cisteína y metionina viene determinada, independiente, por el plegamiento global y en las proximidades del entorno metálico de la proteína.
5. La interacción Cu-SγCys es tanto más fuerte cuanto más cerca está el ion metálico del plano N<sub>His</sub>N<sub>His</sub>S<sub>Cys</sub> formado por los átomos dadores de los ligandos ecuatoriales. Mutantes en la metionina axial, que proporcionan al cobre una geometría más tetraédrica (glutamina, glutamato y cisteína), desplazan al cobre de ese plano haciendo disminuir la velocidad de autotransferencia electrónica. Mutantes en esta metionina, que obligan al cobre a permanecer en dicho plano (leucina), favorecen la velocidad de transferencia electrónica.
6. El principal factor del alto potencial redox de rusticianina es el alto entorno hidrofóbico que rodea al ion metálico.
7. Rusticianina es la proteína azul de cobre más rígida. Es también la más hidrofóbica. Ambas características se deben, en un alto grado, a la existencia del dominio N-terminal de 35 aminoácidos, exclusivo de rusticianina. Estas dos propiedades pueden, a su vez, ser la causa de la alta estabilidad termodinámica de la proteína.
8. El núcleo hidrofóbico de calbindina D<sub>9k</sub> presenta un empaquetamiento muy compacto. Estas condiciones se mantienen en el estado incipiente desplegado de la proteína. Éste es uno de los factores que influyen en su gran estabilidad.
9. Los iones metálicos son esenciales en la estabilidad estructural de calbindina D<sub>9k</sub>.

## VI. CONCLUSIONES

---

10. La mayor movilidad de los lazos en ausencia de ion metálico puede relacionarse con pequeños cambios estructurales y con la rotura de interacciones terciarias fundamentales. Estos cambios pueden ser la causa de la disminución drástica de la estabilidad de apo-Cb con respecto a la calbindina metalada.



# VII. Referencias Bibliográficas



1. Rabi, I. I.; Millman, S.; Kusch, P.; Zacharias, J. R. *Phys. Rev.* **1939**, *55*, 526.
2. Kellogg, J. M. B.; Rabi, I. I.; Ramsey, N. F., Jr.; Zacharias, J. R. *Phys. Rev.* **1939**, *56*, 728.
3. Bloch, F.; Hansen, W. W.; Packard, M. *Phys. Rev.* **1946**, *69*, 127.
4. Purcell, E. M.; Torrey, H. C.; Pound, R. V. *Phys. Rev.* **1946**, *69*, 37.
5. Bloembergen, N.; Purcell, E. M.; Pound, R. V. *Phys. Rev.* **1948**, *73*, 679.
6. Shoolery, J. N. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 731.
7. Arnold, J. T.; Dharmatti, S. S.; Packard, M. E. *J. Chem. Phys.* **1951**, *19*, 507.
8. Ramsey, N. F.; Purcell, E. M. *Phys. Rev.* **1952**, *85*, 143.
9. Karplus, M. *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11.
10. Kaiser, R. *J. Chem. Phys.* **1965**, *42*, 1838.
11. Ernst, R. R.; Anderson, W. A. *Res. Sci. Instr.* **1966**, *37*, 93.
12. Jeener, J. In *Ampere International Summer School: Basko Polje, Monte Negro*, 1971.
13. Aue, W. P.; Bartholdi, E.; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229.
14. Kumar, A.; Ernst, R. R.; Wüthrich, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *95*, 1104.
15. Ernst, R. R.; Bodenhausen, G.; Wokaun, A. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in one and two dimensions*; Oxford University Press: London, 1987.
16. Saunders, M.; Wishnia, A.; Kirkwood, J. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 3289.
17. Cohn, M. In *Biological NMR Spectroscopy*; 1 ed.; Markley, J. L., Opella, S. J., Eds.; Oxford University Press: New York, 1997, pp 16.
18. Shulman, R. G. In *Biological NMR Spectroscopy*; Markley, J. L., Opella, S. J., Eds.; Oxford University Press: New York, 1997, pp 20.
19. Jardetzky, O.; Pappas, P.; Wade, N. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 1657.
20. Bradbury, J. H.; Scheraga, H. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 4240.
21. Jardetzky, O. In *Proc. Intern. Symp. Nucl. Magn. Reson.: Tokyo*, 1965.
22. Markley, J. L.; Putter, I.; Jardetzky, O. *Science* **1968**, *161*, 1249.
23. McDonald, C. C.; Phillips, W. D. In *Magnetic Resonance in Biological Systems*; Ehrenberg, A., Malmström, B. G., Vänngård, T., Eds.; Pergamon: Oxford, 1967, p 3.
24. Gibbons, W. A.; Crepaux, D.; Delayre, J.; Dunand, J.-J.; Hajdukovic, G.; Wyssbrod, H. R. In *Peptides: Chemistry, Structure and Biology*; Walter, R., Meienhofer, J., Eds.; Ann Arbor Sci.: New York, 1976, p 127.

25. Wagner, G.; Kumar, A.; Wüthrich, K. *Eur. J. Biochem.* **1981**, *114*, 375.
26. Braun, W.; Bosch, C.; Brown, L. R.; Go, N.; Wüthrich, K. *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, *667*, 377.
27. Williamson, M. P.; Havel, T. F.; Wüthrich, K. *J. Mol. Biol.* **1985**, *182*, 295.
28. Wüthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; Wiley: New York, 1986.
29. Kline, A. D.; Braun, W.; Wüthrich, K. *J. Mol. Biol.* **1988**, *204*, 675.
30. PDB Annual report, 2002.
31. Hare, D. R.; Reid, B. R. *Biochemistry* **1986**, *25*, 5341.
32. Jiménez-Barbero, J.; Peters, T. *NMR Spectroscopy of glycoconjugates*; Willey-WCH: Weinheim, 2002.
33. Braunschweiler, L.; Ernst, R. R. *J. Magn. Reson.* **1983**, *53*, 521.
34. Morris, G. A.; Freeman, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 760.
35. Bodenhausen, G.; Ruben, D. J. *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69*, 185.
36. Griesinger, C.; Sörensen, O. W.; Ernst, R. R. *J. Magn. Reson.* **1987**, *73*, 574.
37. Oschkinat, H.; Griesinger, C.; Kraulis, P. J.; Sörensen, O. W.; Ernst, R. R. *Nature* **1988**, *332*, 374.
38. Marion, D.; Driscoll, P. C.; Kay, L. E.; Wingfield, P. t.; Bax, A.; Gronenborn, A. M.; Clore, G. M. *Biochemistry* **1989**, *28*, 6150.
39. Ikura, M.; Kay, L. E.; Bax, A. *Biochemistry* **1990**, *29*, 4659.
40. Angeles Jiménez, M.; Rico, M.; Herranz, J.; Santoro, J.; Nieto, J. L. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1038*, 322.
41. Bax, A.; Ikura, M. *J. Biomol. NMR* **1991**, *1*, 99.
42. Spera, S.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5490.
43. Bax, A.; Clore, G. M.; Driscoll, P. C.; Gronenborn, A. M.; Ikura, M.; Kay, L. E. *J. Magn. Reson.* **1990**, *87*, 620.
44. Clubb, R. T.; Wagner, G. *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 389.
45. Schwalbe, H.; Marino, J. P.; King, G. C.; Wechselberger, R.; Bermel, W.; Griesinger, C. *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 631.
46. Bax, A.; Wang, A. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1810.
47. Griesinger, C.; Sörensen, O. W.; Ernst, R. R. *J. Magn. Reson.* **1989**, *84*, 14.
48. Kay, L. E.; Bax, A. *J. Magn. Reson.* **1989**, *86*, 110.

49. Smith, L. J.; Sutcliffe, M. J.; Redfield, C.; Dobson, C. M. *Biochemistry* **1991**, *30*, 986.
50. Hurd, E. *J. Magn. Reson.* **1990**, *87*, 422.
51. Wüthrich, K. In *World Scientific*: Singapore, 1995.
52. Jiménez-Barbero, J. *Anales R.S.E.O.* **2002**, *98*, 18.
53. Kay, L. E.; Torchia, D. A.; Bax, A. *Biochemistry* **1989**, *29*, 7378.
54. Bax, A.; Ikura, M.; Kay, L. E.; Torchia, D. A.; Tschudin, R. *J. Magn. Reson.* **1990**, *86*, 304.
55. Barbato, G.; Ikura, M.; Kay, L. E.; Pastor, R. W.; Bax, A. *Biochemistry* **1992**, *31*, 5269.
56. Wang, A. C.; Grzesiek, S.; Tschudin, R.; Lodi, P. J.; Bax, A. *J. Biomol. NMR* **1995**, *5*, 376.
57. Pervushin, K.; Riek, R.; Wider, G.; Wüthrich, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12366.
58. Riek, R.; Wider, G.; Pervushin, K.; Wüthrich, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 4918.
59. Tolman, J. R.; Flanagan, J. M.; Kennedy, M. A.; Prestegard, J. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 9279.
60. Bax, A. *Protein.Sci.* **2003**, *12*, 1.
61. McConnell, H. M.; Chesnut, D. B. *J. Chem. Phys.* **1958**, *28*, 107.
62. McConnell, H. M.; Robertson, R. E. *J. Chem. Phys.* **1958**, *29*, 1361.
63. Solomon, I. *Phys. Rev.* **1955**, *99*, 559.
64. Bloembergen, N. *J. Chem. Phys.* **1957**, *27*, 575.
65. Shulman, R. G.; Jaccarino, V. *Phys. Rev.* **1956**, *103*, 1126.
66. Shulman, R. G.; Jaccarino, V. *Phys. Rev.* **1957**, *108*, 1219.
67. Shulman, R. G.; Jaccarino, V. *Phys. Rev.* **1958**, *109*, 1084.
68. Jaccarino, V.; Shulman, R. G.; Stout, J. W. *Phys. Rev.* **1957**, *106*, 602.
69. Baker, J. M.; Hayes, W. *Phys. Rev.* **1957**, *106*, 603.
70. Mays, J. M. *Phys. Rev.* **1957**, *108*, 1090.
71. Shulman, R. G. *J. Chem. Phys.* **1958**, *29*, 945.
72. Eaton, D. R.; Josey, A. D.; Phillips, W. D.; Benson, R. E. *Mol. Phys.* **1962**, *5*, 407.
73. Eaton, D. R.; Josey, A. D.; Benson, R. E.; Phillips, W. D.; Cairns, T. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 4100.
74. Eaton, D. R.; Josey, A. D.; Sheppard, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2689.
75. Chatt, J.; Leigh, G. J.; Mingos, D. M. P.; Randall, E. W.; Shaw, D. *Chem. Commun.* **1968**, 419.

76. Randall, E. W.; Shaw, D. *J. Chem. Soc. A* **1969**, 2867.
77. Lowenstein, A.; Shporer, M.; Navon, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2855.
78. Shporer, M.; Lowenstein, A.; Navon, G. *Inorg. Chem.* **1965**, *4*, 358.
79. Davis, D. G.; Kurland, R. J. *J. Chem. Phys.* **1967**, *46*, 388.
80. Chesnut, D. B. *J. Chem. Phys.* **1960**, *33*, 1234.
81. Lincoln, S. F.; Aprile, F.; Dodgen, H. W.; Hunt, J. P. *Inorg. Chem.* **1968**, *7*, 929.
82. Diehl, P.; Leipert, T. *Helv. Chim. Acta* **1964**, *47*, 545.
83. Reuben, J.; Fiat, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 4652.
84. McConnell, H. M.; Holm, C. A. *J. Chem. Phys.* **1957**, *27*, 314.
85. McConnell, H. M.; Holm, C. A. *J. Chem. Phys.* **1958**, *28*, 749.
86. Forman, A.; Murrell, J. N.; Orgel, L. E. *J. Chem. Phys.* **1959**, *31*, 1129.
87. Happe, J. A.; Ward, R. L. *J. Chem. Phys.* **1963**, *39*, 1211.
88. La Mar, G. N.; Horrocks, W. D., Jr.; Allen, L. C. *J. Chem. Phys.* **1964**, *41*, 2126.
89. Horrocks, W. D., Jr.; Taylor, R. C.; La Mar, G. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 3031.
90. Eaton, D. R.; Phillips, W. D.; Caldwell, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 397.
91. Szarek, W. A.; Dent, E.; Grindley, T. B.; Baird, M. C. *Chem. Commun.* **1969**, 953.
92. Swift, T. J.; Connick, R. E. *J. Chem. Phys.* **1962**, *37*, 307.
93. Lewis, W. B.; Jackson, J. A.; Lemons, J. F.; Taube, H. *J. Chem. Phys.* **1962**, *36*, 694.
94. Muetterties, E. L.; Wright, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 4706.
95. Siddall, T. H., 3<sup>rd</sup>; Stewart, W. E.; Harraker, D. G. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1967**, *3*, 479.
96. Siddall, T. H., 3<sup>rd</sup>; Prohaska, C. A. *Inorg. Chem.* **1965**, *4*, 783.
97. Sheppard, J. C.; Burdett, J. L. *Inorg. Chem.* **1966**, *5*, 921.
98. Reuben, J.; Fiat, D. *J. Chem. Phys.* **1967**, *47*, 5440.
99. Karkaker, D. G.; Siddall, T. H., 3<sup>rd</sup>; Stewart, W. E. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1969**, *31*, 711.
100. La Mar, G. N.; Horrocks, J., W.D., Eds. *NMR of Paramagnetic Molecules*; Academic Press: New York, 1973.
101. Kowalsky, A. *Biochemistry* **1965**, *4*, 2382.
102. Dickerson, R. E.; Timkovich, R. In *The Enzymes*; 3 ed.; Boyer, P. D., Ed.; Academic Press: New York, 1975, pp 397.

103. Bertini, I.; Gray, H. B.; Lippard, S. J.; Valentine, J., S., Eds. *Bioinorganic Chemistry*; University Science Books: Mill Valley, CA, 1994.
104. Cammack, R.; Sykes, A. G., Eds. *Advances in Inorganic Chemistry. Iron Sulfur Proteins*; Academic Press: San Diego, 1992.
105. Beinert, H. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, 5, 2.
106. Bertini, I.; Luchinat, C. *NMR of paramagnetic molecules in biological systems*; Benjamin/Cummings: Menlo Park, CA, 1986.
107. Bertini, I.; Turano, P.; Vila, A. J. *Chem. Rev.* **1993**, 93, 2833.
108. La Mar, G. N. *Biological Magnetic Resonance*; Plenum Press: New York, 1993; Vol. 12.
109. Jackson, J. T.; La Mar, G. N.; Bartsch, R. G. *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 1799.
110. Wüthrich, K.; Shulman, R. G.; Wyluda, B. J.; Caughey, W. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1969**, 62, 636.
111. Wüthrich, K. *Struct. Bonding* **1970**, 8, 53.
112. Gupta, R. K.; Redfield, A. G. *Science* **1970**, 169, 1204.
113. Gupta, R. K.; Koenig, S. H.; Redfield, A. G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1970**, 41, 273.
114. Redfield, A. G.; Gupta, G. P. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1971**, 36, 405.
115. Wüthrich, K.; Shulman, R. G.; Yamane, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1968**, 61, 1199.
116. Sheard, B.; Yamane, T.; Shulman, R. G. *J. Mol. Biol.* **1970**, 53, 35.
117. Ogawa, S.; Shulman, R. G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1971**, 42, 9.
118. Wüthrich, K.; Shulman, R. G.; Yamane, T.; Wyluda, B. J.; Hugli, T. E.; Gurd, F. R. N. *J. Biol. Chem.* **1979**, 245, 1947.
119. Goff, H. M.; La Mar, G. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 6599.
120. La Mar, G. N.; Budd, D. L.; Goff, H. M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, 77, 104.
121. La Mar, G. N.; Budd, D. L.; Smith, K. M.; Langry, K. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 1822.
122. La Mar, G. N.; Anderson, R. R.; Budd, D. L.; Smith, K. M.; Langry, K. C.; Gersonde, K.; Sick, H. *Biochemistry* **1981**, 20, 4429.
123. Satterlee, J. D.; Erman, J. E. *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, 743, 149.
124. Sotokawa, H.; Shimizu, T.; Hatano, M. *Inorg. Chim. Acta* **1985**, 108, 67.
125. Kimura, K.; Peterson, J.; Wilson, M.; Cookson, D. J.; Williams, R. J. *J. Inorg. Biochem.* **1981**, 15, 11.
126. Timkovich, R.; Cork, M. S. *Biochemistry* **1982**, 21, 5119.

127. Timkovich, R.; Cork, M. S.; Taylor, P. V. *J. Inorg. Biochem.* **1984**, *22*, 21.
128. Johnson, R. D.; Ramaprasad, S.; La Mar, G. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 7205.
129. Santos, H.; Turner, D. L.; Xavier, A. V.; LeGall, J. *J. Magn. Reson.* **1984**, *59*, 177.
130. Mc Lachan, S. J.; La Mar, G. N.; Lee, K.-B. *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *957*, 430.
131. Emerson, S. D.; La Mar, G. N. *Biochemistry* **1990**, *29*, 1545.
132. Kumar, A.; Ernst, R. R.; Wüthrich, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *95*, 1.
133. Banci, L.; Bertini, I.; Luchinat, C.; Piccioli, M.; Scozzafava, A.; Turano, P. *Inorg. Chem.* **1989**, *28*, 4650.
134. Frye, J. S.; La Mar, G. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3561.
135. La Mar, G. N.; Del Gaudio, J.; Frye, J. S. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *498*, 422.
136. Emerson, S. D.; La Mar, G. N. *Biochemistry* **1990**, *29*, 1556.
137. Gochin, M.; Roder, H. *Protein Sci.* **1995**, *4*, 296.
138. Banci, L.; Pierattelli, R.; Turner, D. L. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *232*, 522.
139. Banci, L.; Bertini, I.; Savellini, G. G.; Romagnoli, A.; Turano, P.; Cremonini, M. A.; Luchinat, C.; Gray, H. B. *Proteins* **1997**, *29*, 68.
140. Arnesano, F.; Banci, L.; Bertini, I.; Faraone-Mennella, J.; Rosato, A.; Barker, P. D.; Fersht, A. R. *Biochemistry* **1999**, *38*, 8657.
141. Banci, L.; Bertini, I.; Branchini, B. R.; Hajjeva, P.; Spyroulias, G. A.; Turano, P. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, *6*, 490.
142. Banci, L.; Bertini, I.; Liu, G.; Lu, J.; Reddig, T.; Tang, W.; Wu, Y.; Yao, Y.; Zhu, D. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, *6*, 628.
143. Güntert, P.; Mumenthaler, C.; Wüthrich, K. *J. Mol. Biol.* **1997**, *273*, 283.
144. Banci, L.; Bertini, I.; Cremonini, M. A.; Gori Savellini, G.; Luchinat, C.; Wüthrich, K.; Güntert, P. *J. Biomol. NMR* **1998**, *12*, 553.
145. Hus, J. C.; Marion, D.; Blackledge, M. *J. Mol. Biol.* **2000**, *298*, 927.
146. Dosset, P.; Hus, J. C.; Marion, D.; Blackledge, M. *J. Biomol. NMR* **2001**, *20*, 223.
147. Hus, J. C.; Marion, D.; Blackledge, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1541.
148. Gibson, J. F.; Hall, D. O.; Thornley, J. H. M.; Whatley, F. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1966**, *56*, 987.
149. Dunham, W. R.; Palmer, G.; Sands, R. H.; Bearden, A. J. *Biochim. Biophys. Acta* **1971**, *253*, 373.



150. Bertini, I.; Lanini, G.; Luchinat, C. *Inorg. Chem.* **1984**, *23*, 2729.
151. Banci, L.; Bertini, I.; Luchinat, C. *Struct. Bonding* **1990**, *72*, 113.
152. Skjeldal, L.; Westler, W. M.; Markley, J. L. *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, *278*, 482.
153. Dugad, L. B.; La Mar, G. N.; Banci, L.; Bertini, I. *Biochemistry* **1990**, *29*, 2263.
154. Banci, L.; Bertini, I.; Briganti, F.; Luchinat, C.; Scozzafava, A.; Vicens Oliver, M. *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 4517.
155. Banci, L.; Bertini, I.; Briganti, F.; Luchinat, C.; Scozzafava, A.; Vicens Oliver, M. *Inorg. Chim. Acta* **1991**, *180*, 171.
156. Banci, L.; Bertini, I.; Capozzi, F.; Carloni, P.; Ciurli, S.; Luchinat, C.; Piccioli, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3431.
157. Donaire, A.; Gorst, C. M.; Zhou, Z. H.; Adams, M. W. W.; La Mar, G. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6841.
158. Chan, T.-M.; Markley, J. L. *Biochemistry* **1983**, *22*, 6008.
159. Oh, B.-H.; Markley, J. L. *Biochemistry* **1990**, *29*, 3993.
160. Oh, B.-H.; Mooberry, E. S.; Markley, J. L. *Biochemistry* **1990**, *29*, 4004.
161. Oh, B.-H.; Markley, J. L. *Biochemistry* **1990**, *29*, 4012.
162. Cheng, H.; Westler, W. M.; Xia, B.; Oh, B. H.; Markley, J. L. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *316*, 619.
163. Banci, L.; Bertini, I.; Eltis, L. D.; Felli, I. C.; Kastrau, D. H. W.; Luchinat, C.; Piccioli, M.; Pierattelli, R.; Smith, M. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *225*, 715.
164. Bertini, I.; Eltis, L. D.; Felli, I. C.; Kastrau, D. H. W.; Luchinat, C.; Piccioli, M. *Chemistry - A European Journal* **1995**, *1*, 598.
165. Wang, P. L.; Donaire, A.; Zhou, Z. H.; Adams, M. W. M.; La Mar, G. N. *Biochemistry* **1996**, *32*, 11319.
166. Bertini, I.; Donaire, A.; Luchinat, C.; Rosato, A. *Proteins* **1997**, *29*, 348.
167. Aono, S.; Bentreop, D.; Bertini, I.; Donaire, A.; Luchinat, C.; Niikura, Y.; Rosato, A. *Biochemistry* **1998**, *37*, 9812.
168. Banci, L.; Bertini, I.; Eltis, L. D.; Felli, I. C.; Kastrau, D. H.; Luchinat, C.; Piccioli, M.; Pierattelli, R.; Smith, M. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *225*, 715.
169. McDonald, C. C.; Phillips, W. D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1969**, *35*, 43.
170. Inubushi, T.; Ikeda-Saito, M.; Yonetani, T. *Biochemistry* **1983**, *22*, 2904.

171. Bertini, I.; Luchinat, C. In *Adv. Inorg. Biochem*; Eichorn, G. L., Marzilli, L. G., Eds.; Elsevier: New York, 1984; Vol. 6, pp 71.
172. Donaire, A.; Salgado, J.; Jiménez, H. R.; Moratal, J. M. In *Nuclear Magnetic Resonance of Paramagnetic Macromolecules*; La Mar, G. N., Ed.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1995, pp 213.
173. Banci, L.; Piccioli, M. In *Encyclopedia of Magnetic Resonance*; Grant, D. M., Harris, R. K., Eds.; *Enycl. of Nuclear Magn. Reson.*, 1996, pp 1365.
174. Bertini, I.; Canti, G.; Luchinat, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 4943.
175. Bertini, I.; Luchinat, C.; Messori, L.; Monnanni, R.; Auld, D. S.; Riordan, J. F. *Biochemistry* **1988**, *27*, 8318.
176. Bertini, I.; Gerber, M.; Lanini, G.; Luchinat, C.; Maret, W.; Rawer, S.; Zeppezauer, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1826.
177. Auld, D. S.; Bertini, I.; Donaire, A.; Messori, L.; Moratal Mascarell, J. M. *Biochemistry* **1992**, *31*, 3840.
178. Bertini, I.; Canti, G.; Luchinat, C.; Mani, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7784.
179. Banci, L.; Bertini, I.; Luchinat, C.; Donaire, A.; Martínez, M.-J.; Moratal Mascarell, J. M. *Comments Inorg. Chem.* **1990**, *9*, 245.
180. Banci, L.; Bertini, I.; Luchinat, C.; Monnanni, R.; Moratal Mascarell, J. M. *Gazz. Chim. Ital.* **1989**, *119*, 23.
181. Bertini, I.; Luchinat, C.; Piccioli, M.; Vicens Oliver, M.; Viezzoli, M. S. *Eur. Biophys. J.* **1991**, *20*, 269.
182. Banci, L.; Bertini, I.; Luchinat, C.; Piccioli, M. *FEBS Lett.* **1990**, *272*, 175.
183. Bertini, I.; Luchinat, C.; Tarchi, D. *Chem. Phys. Lett.* **1993**, *203*, 445.
184. Bertini, I.; Luchinat, C.; Piccioli, M.; Tarchi, D. *Concepts Magn. Reson.* **1994**, *6*, 307.
185. Hill, H. A. O.; Storm, C. B.; Ambler, R. P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, *70*, 783.
186. Hill, H. A. O.; Leer, J. C.; Smith, B. E.; Storm, C. B.; Ambler, R. P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, *70*, 331.
187. Blaszak, J. A.; Ulrich, E. L.; Markley, J. L.; McMillin, D. R. *Biochemistry* **1982**, *21*, 6253.
188. Moratal Mascarell, J. M.; Salgado, J.; Donaire, A.; Jiménez, H. R.; Castells, J. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 110.
189. Moratal Mascarell, J. M.; Salgado, J.; Donaire, A.; Jiménez, H. R.; Castells, J. *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 3587.

190. Moratal Mascarell, J. M.; Salgado, J.; Donaire, A.; Jiménez, H. R.; Castells, J.; Martínez Ferrer, M.J. *Magn. Reson. Chem.* **1993**, *31*, S41.
191. Salgado, J.; Jiménez, H. R.; Donaire, A.; Moratal, J. M. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *231*, 358.
192. Vila, A. J. *FEBS Lett.* **1994**, *355*, 15.
193. Fernández, C. O.; Sannazzaro, A. I.; Vila, A. J. *Biochemistry* **1997**, *36*, 10566.
194. Fernández, C. O.; Sannazzaro, A. I.; Diaz, L. E.; Vila, A. J. *Inorg. Chim. Acta* **1998**, *273*, 367.
195. Salgado, J.; Jiménez, H. R.; Moratal, J. M.; Kroes, S. J.; Warmerdam, G. C. M.; Canters, G. W. *Biochemistry* **1996**, *35*, 1810.
196. Salgado, J.; Kroes, S. J.; Berg, A.; Moratal, J. M.; Canters, G. W. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 177.
197. Salgado, J.; Kalverda, A. P.; Diederix, R. E.; Canters, G. W.; Moratal, J. M.; Lawler, A. T.; Dennison, C. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*, 457.
198. Kalverda, A. P.; Salgado, J.; Dennison, C.; Canters, G. W. *Biochemistry* **1996**, *35*, 3085.
199. Bertini, I.; Ciurli, S.; Dikiy, A.; Luchinat, C.; Martini, G.; Safarov, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2037.
200. Hinckley, C. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 5160.
201. Sanders, J. K. M.; Williams, D. H. *Chem. Commun.* **1970**, 422.
202. Demarco, P. V.; Elzey, T. K.; Lewis, R. B.; Wenkert, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5734.
203. Briggs, J.; Frost, G. H.; Hart, F. A.; Moss, G. P.; Staniforth, M. L. *Chem. Commun.* **1970**, 749.
204. Horrocks, J., W.D.; Sipe, J. P., 3<sup>rd</sup> *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 6800.
205. Horrocks, J., W.D.; Sipe, J. P., 3<sup>rd</sup> *Science* **1972**, *177*, 995.
206. Bleaney, B. *J. Magn. Reson.* **1972**, *8*, 91.
207. Campbell, I. D.; Dobson, C. M.; Williams, R. J. P.; Xavier, A. V. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1973**, *222*, 163.
208. Campbell, I. D.; Dobson, C. M.; Williams, R. J. P. *Proc. Roy. Soc. London* **1975**, *A345*, 41.
209. Sowadski, J.; Cornick, G.; Kretsinger, R. H. *J. Mol. Biol.* **1978**, *124*, 123.
210. Horrocks, J., W.D.; Sudnick, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 334.
211. Lee, L.; Sykes, B. D. *Biochemistry* **1980**, *19*, 3208.
212. Lee, L.; Sykes, B. D. In *Advances in Inorganic Biochemistry, Volume 2*; Darnall, D. W., Wilkins, R. G., Eds.; Elsevier: New York, 1980, p 183.
213. Lee, L.; Sykes, B. D. *Biophys. J.* **1980**, *32*, 193.

- 
214. Lee, L.; Sykes, B. D. *Biochemistry* **1981**, *20*, 1156.
215. Lee, L.; Sykes, B. D. *Biochemistry* **1983**, *22*, 4366.
216. Messori, L.; Piccioli, M. *J. Inorg. Biochem.* **1991**, *42*, 185.
217. Bentrop, D.; Bertini, I.; Cremonini, M. A.; Forsén, S.; Luchinat, C.; Malmendal, A. *Biochemistry* **1997**, *36*, 11605.
218. Bertini, I.; Felli, I. C.; Luchinat, C. *J. Biomol. NMR* **2000**, *18*, 347.
219. Bertini, I.; Janik, M. B.; Liu, G.; Luchinat, C.; Rosato, A. *J. Magn. Reson.* **2001**, *148*, 23.
220. Bertini, I.; Lee, Y. M.; Luchinat, C.; Piccioli, M.; Poggi, L. *Chembiochem* **2001**, *2*, 550.
221. Barbieri, R.; Bertini, I.; Cavallaro, G.; Lee, Y. M.; Luchinat, C.; Rosato, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5581.
222. Barbieri, R.; Bertini, I.; Lee, Y. M.; Luchinat, C.; Velders, A. H. *J. Biomol. NMR* **2002**, *22*, 365.
223. Bertini, I.; Luchinat, C. *NMR of paramagnetic substances*; 1 ed.; Coord. Chem. Rev. 150, Elsevier: Amsterdam, 1996.
224. Griffith, J. S. *The theory of transition-metal ions*; 1 ed.; Cambridge University Press: Cambridge, 1961.
225. Coremans, J. W. A.; Poluektov, O. G.; Groenen, E. J. J.; Canters, G. W.; Nar, H.; Messerschmidt, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3097.
226. van Gastel, M.; Canters, G. W.; Krupka, H.; Messerschmidt, A.; de Waal, E. C.; Warmerdam, G. C. M.; Groenen, E. J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2322.
227. Penfield, K. W.; Gewirth, A. A.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4519.
228. Banci, L.; Bertini, I.; Bren, K. L.; Cremonini, M. A.; Gray, H. B.; Luchinat, C.; Turano, P. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1996**, *1*, 117.
229. Guiles, R. D.; Sarma, S.; DiGate, R. J.; Banville, D.; Basus, V. J.; Kuntz, I. D.; Waskell, L. *Nature struct. Biol.* **1996**, *3*, 333.
230. Donaire, A.; Salgado, J.; Moratal, J. M. *Biochemistry* **1998**, *37*, 8659.
231. Banci, L.; Bertini, I.; Luchinat, C. *Nuclear and electron relaxation. The magnetic nucleus-unpaired electron coupling in solution*; VCH: Weinheim, 1991.
232. Einstein, A. *Investigations on the Theory of the Brownian Movement*; Dover: New York, 1956.
233. Stokes, G. *Trans. Cambridge Philos. Soc.* **1956**, *9*, 5.
234. La Mar, G. N.; de Ropp, J. S. In *Biological Magnetic Resonance*; Berliner, L. J., Reuben, J., Eds.; Plenum Press: New York, 1993; Vol. 12, pp 1.

235. Cotton, F. A.; Wilkinson, G. *Advanced Inorganic Chemistry*; 4 ed.; Wiley: New York, 1990.
236. Sykes, A. G. In *Advances in Inorganic Chemistry*; Sykes, A. G., Ed.; Academic Press: New York, 1991, pp 377.
237. Bertini, I.; Luchinat, C.; Parigi, G. *Solution NMR of paramagnetic molecules. Applications to metallobiomolecules and models, Currents Methods in Inorganic Chemistry*; Elsevier: Amsterdam, 2001; Vol. 2.
238. Bertini, I.; Piccioli, M.; Scozzafava, A.; Viezzoli, M. S. *Magn. Reson. Chem.* **1993**, *31*, S17.
239. Dennison, C.; Vijgenboom, E.; de Vries, S.; van der Oost, J.; Canters, G. W. *FEBS Lett.* **1995**, *365*, 92.
240. Bertini, I.; Bren, K. L.; Clemente, A.; Fee, J. A.; Gray, H. B.; Luchinat, C.; Malmström, B. G.; Richards, J. H.; Sanders, D.; Slutter, C. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *46*, 11658.
241. Salgado, J.; Warmerdam, G.; Bubacco, L.; Canters, G. W. *Biochemistry* **1998**, *37*, 7378.
242. Fernández, C. O.; Cricco, J. A.; Slutter, C. E.; Richards, J. H.; Gray, H. B.; Vila, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11678.
243. Kroes, S. J.; Salgado, J.; Parigi, G.; Luchinat, C.; Canters, G. W. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1996**, *1*, 551.
244. Banci, L.; Pierattelli, R.; Vila, A. J. *Adv. Prot. Chem.* **2002**, *60*, 397.
245. Vila, A. J.; Fernández, C. O. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7291.
246. Fernández, C. O.; Niizeki, T.; Kohzuma, T.; Vila, A. J. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2002**, *8*, 75.
247. Vila, A. J.; Fernández, C. O. In *Handbook of Metalloproteins*; Bertini, I., Sigel, H., Eds.; Marcel Dekker: New York, 2001, pp 813.
248. Allegrozzi, M.; Bertini, I.; Janik, M. B.; Lee, Y. M.; Liu, G.; Luchinat, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4154.
249. Bertini, I.; Janik, M. B.; Lee, Y. M.; Luchinat, C.; Rosato, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4181.
250. Gadian, D. G. *Nuclear Magnetic resonance and its applications to living systems*; Clarendon Press: Oxford, 1982.
251. Inubushi, T.; Becker, E. D. *J. Magn. Reson.* **1983**, *51*, 128.
252. Chen, Z. G.; de Ropp, J. S.; Hernández, G.; La Mar, G. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 8772.
253. Neuhaus, D.; Williamson, M. *The nuclear Overhauser effect in structural and conformational analysis*; VCH: New York, 1989.
254. Bertini, I.; Banci, L.; Luchinat, C. *Methods. Enzymol.* **1989**, *177*, 246.

- 
255. Busse, S. C.; La Mar, G. N.; Yu, L. P.; Howard, J. B.; Smith, E. T.; Zhou, Z. H.; Adams, M. W. W. *Biochemistry* **1992**, *31*, 11952.
256. Banci, L.; Bertini, I.; Ciurli, S.; Ferretti, S.; Luchinat, C.; Piccioli, M. *Biochemistry* **1993**, *32*, 9387.
257. Fraústo da Silva, J. J. R.; Williams, R. J. P. *The biological chemistry of the elements*; 2 ed.; Oxford University Press: New York, 2001.
258. Bertini, I.; Rosato, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3601.
259. Bertini, I.; Sigel, H., Eds. *Handbook of Metalloproteins*; Marcel Dekker: New York, 2001.
260. Malmström, B. G.; Vänngård, T. *J. Mol. Biol.* **1960**, *2*, 118.
261. Gray, H. B.; Malmström, B. G.; Williams, R. J. P. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 551.
262. Messerschmidt, A. *Struct. Bonding* **1998**, *90*, 37.
263. Reinbothe, C.; Buhr, F.; Pollmann, S.; Reinbothe, S. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 807.
264. Hamalainen, E. R.; Kempainen, R.; Kuivaniemi, H.; Tromp, G.; Vaheri, A.; Pihlajaniemi, T.; Kivirikko, K. I. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 21590.
265. Randall, D. W.; Gamelin, D. R.; LaCroix, L. B.; Solomon, E. I. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 16.
266. Pattison, I. H.; Jebbett, J. N. *Res. Vet. Sci.* **1971**, *12*, 378.
267. Hornshaw, M. P.; McDermott, J. R.; Candy, J. M.; Lakey, J. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *214*, 993.
268. Brown, D. R.; Sassoon, J. *J. Mol. Biotechnol.* **2002**, *22*, 165.
269. Prusiner, S. B. *Science* **1982**, *216*, 136.
270. Collinge, J. *Annu. Rev. Neurosci.* **2001**, *2001*, 519.
271. Bush, A. I.; Pettingell, W. H.; Multhaup, G.; Paradis, M.; Vonsattel, J. P.; Gusella, J. F.; Beyreuther, K.; Masters, C. L.; Tanzi, R. E. *Science* **1994**, *265*, 1464.
272. Atwood, C. S.; Moir, R. D.; Huang, X.; Scarpa, R. C.; Bacarra, N. M.; Romano, D. M.; Hartshorn, M. A.; Tanzi, R. E.; Bush, A. I. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 12817.
273. Maynard, C. J.; Cappai, R.; Volitakis, I.; Cherny, R. A.; White, A. R.; Beyreuther, K.; Masters, C. L.; Bush, A. I.; Li, Q. X. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 44670.
274. Barnham, K. J.; McKinstry, W. J.; Multhaup, G.; Galatis, D.; Morton, C. J.; Curtain, C. C.; Williamson, N. A.; White, A. R.; Hinds, M. G.; Norton, R. S.; Beyreuther, K.; Masters, C. L.; Parker, M. W.; Cappai, R. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 17401.
275. Decker, H.; Terwilliger, N. J. *J. Exp. Biol.* **2000**, *203*, 1777.

276. Battaini, G.; Monzani, E.; Casella, L.; Lonardi, E.; Tepper, A. W.; Canters, G. W.; Bubacco, L. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 44606.
277. Bubacco, L.; van Gastel, M.; Groenen, E. J.; Vijgenboom, E.; Canters, G. W. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 7381.
278. Bykova, N. V.; Stensballe, A.; Egsgaard, H.; Jensen, O. N.; Moller, I. M. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 24.
279. Bykova, N. V.; Egsgaard, H.; Moller, I. M. *FEBS Lett.* **2003**, *540*, 141.
280. Bateman, O. A.; Purkiss, A. G.; van Montfort, R.; Slingsby, C.; Graham, C.; Wistow, G. *Biochemistry* **2003**, *42*, 4349.
281. Malkin, R.; Malmström, B. G. *Adv. Enzymol.* **1970**, *33*, 177.
282. Zaitseva, I.; Zaitsev, V.; Card, G.; Moshkov, K.; Bax, B.; Ralph, A.; Lindley, P. F. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1996**, *1*, 15.
283. Zaitsev, V.; Zaitseva, I.; Papiz, M.; Lindley, P. F. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*.
284. Dennison, C.; Berg, A.; de Vries, S.; Canters, G. W. *FEBS Lett.* **1996**, *394*, 340.
285. Malmström, B. G.; Aasa, R. *FEBS Lett.* **1993**, *325*, 49.
286. Iwata, S.; Ostermeier, C.; Ludwig, B.; Michel, H. *Nature* **1995**, *376*, 660.
287. Brown, K.; Prudencio, M.; Pereira, A. S.; Besson, S.; Moura, J. J.; Moura, I.; Cambillau, C. *Nature Struct. Biol.* **2000**, *7*, 191.
288. Rasmussen, T.; Berks, B. C.; Sanders-Loehr, J.; Dooley, D. M.; Zumft, W. G.; Thomson, A. J. *Biochemistry* **2000**, *39*.
289. Farrar, J. A.; Zumft, W. G.; Thomson, A. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 9891.
290. Charnock, J. M.; Dreusch, A.; Körner, H.; Neese, F.; Nelson, J.; Kannt, A.; Michel, H.; Garner, C. D.; Kroneck, P. M. H.; Zumft, W. G. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 1368.
291. Butler, C. S.; Harriet, E. S.; Greenwood, C.; Thomson, A. J. *Biochemistry* **1997**, *36*, 16259.
292. Camakaris, J.; Voskoboinik, I.; Mercer, J. F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *261*, 225.
293. Mercer, J. F.; Barnes, N.; Stevenson, J.; Strausak, D.; Llanos, R. M. *Biometals* **2003**, *16*, 175.
294. Banci, L.; Rosato, A. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 215.
295. Broman, L.; Malmström, B. G.; Aasa, R.; Vänngård, T. *J. Mol. Biol.* **1962**, *5*, 301.
296. Malmström, B. G. In *Oxidases and related redox systems*; King, T. E., Mason, H. S., Morrison, M., Eds.; Wiley: New York, 1965, pp 207.

- 
297. Fee, J. A.; Malkin, R.; Malmström, B. G.; Vänngård, T. *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 4200.
298. Malmström, B. G. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *233*, 711.
299. Adman, E. T. *Adv. Prot. Chem.* **1991**, *42*, 144.
300. Solomon, E. I.; Hare, J. W.; Gray, H. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *97*, 2092.
301. Guss, J. M.; Freeman, H. C. *J. Mol. Biol.* **1983**, *169*, 521.
302. Guss, J. M.; Bartunik, H. D.; Freeman, H. C. *Acta Cryst. B* **1992**, *48*, 790.
303. Molina-Heredia, F. P.; Balme, A.; Hervás, M.; Navarro, J. A.; De la Rosa, M. A. *FEBS Lett.* **2002**, *517*, 50.
304. Rydén, L. G.; Hunt, L. T. *J. Mol. Evol.* **1993**, *36*, 41.
305. Hart, P. J.; Nersissian, A. M.; Herrmann, R. G.; Nalbandyan, R. M.; Valentine, J. S.; Eisenberg, D. *Protein Sci.* **1996**, *5*, 2175.
306. Aikazyan, V. T.; Nalbandyan, R. M. *FEBS Lett.* **1979**, *104*, 127.
307. Einsle, O.; Mehrabian, Z.; Nalbandyan, R. M.; Messerschmidt, A. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 666.
308. Nersissian, A. M.; Immoos, C.; Hill, M. G.; Hart, P. J.; Williams, G.; Herrmann, R. G.; Valentine, J. S. *Protein Sci.* **1998**, *7*, 1915.
309. Peisach, J.; Levine, W. G.; Blumberg, W. E. *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 2847.
310. Nersissian, A. M.; Mehrabian, Z. B.; Nalbandyan, R. M.; Hart, P. J.; Fraczkiwicz, G.; Czernuszewicz, R. S.; Bender, C. J.; Peisach, J.; Herrmann, R. G.; Valentine, J. S. *Protein Sci.* **1996**, *5*, 2184.
311. Marchesini, A.; Minelli, M.; Merkle, H.; Kroneck, P. M. H. *Eur. J. Biochem.* **1979**, *101*, 77.
312. Schinina, M. E.; Maritano, S.; Barra, D.; Mondovi, B.; Marchesini, A. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1297*, 28.
313. Paul, K. G.; Stigbrand, T. *Biochim. Biophys. Acta* **1970**, *221*, 255.
314. van Driessche, G.; Dennison, C.; Sykes, A. G.; van Beeumen, J. *Protein Sci.* **1995**, *4*, 209.
315. Scharf, B.; Engelhard, M. *Biochemistry* **1993**, *32*, 12894.
316. Scharf, B.; Engelhard, M. *Biochemistry* **1994**, *33*, 6387.
317. Mattar, S.; Scharf, B.; Kent, S. B. H.; Rodewald, K.; Oersterhelt, D.; Engelhard, M. *J. Biol. Chem.* **1994**, *268*, 14939.
318. Horio, T. *J. Biochem.* **1958**, 267.
319. Groeneveld, M.; Aasa, R.; Reinhammar, B.; Canters, G. W. J. *Inorg. Biochem.* **1987**, *31*, 143.



320. Canters, G. W.; Gilardi, G. *FEBS Lett.* **1993**, *325*, 39.
321. Liu, M.-Y.; Liu, M. C.; Payne, W. J.; LeGall, J. *J. Bacteriol.* **1986**, *166*, 604.
322. Adman, E. T.; Turley, S.; Bramson, R.; Petratos, K.; Banner, D.; Tsernoglous, D.; Beppu, T.; Watanabe, H. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 87.
323. Tobari, J.; Harada, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, *101*, 502.
324. Houwelingen, T. v.; Canters, G. W.; Stobbelaar, G.; Duine, J.; Frank, J.; Tsugita, A. *Eur. J. Biochem.* **1985**, *153*, 75.
325. Trost, J. T.; McManus, J. D.; Freeman, J. C.; Ramakrishna, B. L.; Blankenship, R. E. *Biochemistry* **1988**, *27*, 7858.
326. Cobley, J. G.; Haddock, B. A. *FEBS Lett.* **1975**, *60*, 29.
327. Ingledew, W. J.; Cox, J. C.; Halling, P. J. *FEMS Microbiol. Lett.* **1977**, *2*, 193.
328. Cox, J. C.; Aasa, R.; Malmström, B. G. *FEBS Lett.* **1978**, *93*, 157.
329. Nar, H.; Messerschmidt, A.; Huber, R.; van de Kamp, M.; Canters, G. W. *J. Mol. Biol.* **1991**, *221*, 765.
330. Walter, R. L.; Ealick, S. E.; Friedman, A. M.; Blake, R. C. 2<sup>nd</sup>; Proctor, P.; Shoham, M. *J. Mol. Biol.* **1996**, *263*, 730.
331. Dodd, F. E.; Abraham, Z. H.; Eady, R. R.; Hasnain, S. S. *Acta Cryst. D* **2000**, *56*, 690.
332. Inoue, T.; Nishio, N.; Suzuki, S.; Kataoka, K.; Kohzuma, T.; Kai, Y. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 17845.
333. Cunane, L. M.; Chen, Z. W.; Durley, R. C. E.; Mathews, F. S. *Acta Cryst. D* **1996**, *52*, 676.
334. Baker, E. N. *J. Mol. Biol.* **1988**, *203*, 1071.
335. Shepard, W. E. B.; Anderson, B. F.; Lewandoski, D. A.; Norris, G. E.; Baker, E. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7817.
336. Guss, J. M.; Harrowell, P. R.; Murata, M.; Norris, V. A.; Freeman, H. C. *J. Mol. Biol.* **1986**, *192*, 361.
337. Harvey, I.; Hao, Q.; Duke, E. M.; Ingledew, W. J.; Hasnain, S. S. *Acta Cryst. D* **1998**, *54*, 629.
338. Vakoufari, E.; Wilson, K. S.; Petratos, K. *FEBS Lett.* **1994**, *347*, 203.
339. Shepard, W. E. B.; Kingston, R. L.; Anderson, B. F.; Baker, E. N. *Acta Cryst. D* **1993**, *D49*, 331.
340. Nar, H.; Messerschmidt, A.; Huber, R.; van de Kamp, M.; Canters, G. W. *FEBS Lett.* **1992**, *306*, 119.

- 
341. Garrett, T. P. J.; Clingeleffer, D. J.; Guss, J. M.; Rogers, S. J.; Freeman, H. C. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 2822.
342. Vallee, B. L.; Williams, R. J. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1968**, *59*, 498.
343. Williams, R. J. P. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *234*, 363.
344. Langen, R.; Colon, J. L.; Casimiro, D. R.; Karpishin, J. R.; Winkler, J. R.; Gray, H. B. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1996**, *1*, 221.
345. Di Bilio, A. J.; Hill, M. G.; Bonander, N.; Karlson, B. G.; Villahermosa, R. M.; Malmström, B. G.; Winkler, J. R.; Gray, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9921.
346. Skov, L. K.; Pascher, T.; Winkler, J. R.; Gray, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*.
347. LaCroix, L. B.; Shadle, S. E.; Wang, Y. N.; Averill, B. A.; Hedman, B.; Hodgson, K. O.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7755.
348. LaCroix, L. B.; Randall, D. W.; Nersissian, A. M.; Hoitink, C. W. G.; Canters, G. W.; Valentine, J., S.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9621.
349. Diederix, R. E.; Canters, G. W.; Dennison, C. *Biochemistry* **2000**, *39*, 9551.
350. Adman, E. T.; Godden, J. E.; Turley, S. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 27458.
351. Penfield, K. W.; Gay, R. R.; Himmelwright, R. S.; Eickman, N. C.; Norris, V. A.; Freeman, H. C.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4382.
352. DeBeer, S.; Kiser, C. N.; Mines, G. A.; Richards, J. H.; Gray, H. B.; Solomon, E. I.; Hedman, B.; Hodgson, K. O. *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 433.
353. Gewirth, A. A.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3811.
354. Tezcan, F. A.; Winkler, J. R.; Gray, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13383.
355. Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Loschi, L.; Righi, F.; Sola, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 501.
356. Marcus, R. A.; Sutin, N. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *811*, 265.
357. Gray, H. B.; Ellis, W. R., Jr. In *Bioinorganic Chemistry*; Bertini, I., Gray, H. B., Lippard, S. J., Valentine, J. S., Eds.; University Science Books: Mill Valley, CA, 1994, pp 315.
358. Ryde, U.; Olsson, M. H.; Roos, B. O.; De Kerpel, J. A. O.; Pierloot, K. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 565.
359. Canters, G. W.; Dennison, C. *Biochimie* **1995**, *77*, 506.
360. Ingledew, W. J.; Cocco, D. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *590*, 141.
361. Rawlings, D. E.; Silver, S. *Bio/Technology* **1995**, *13*, 773.

- 
362. Bos, P.; Kuenen, G. In *Microbial mineral recovery*; Ehrlich, H. L., Brierley, C. L., Eds.; McGraw-Hill Publishing Company: New York, 1990.
363. Hall, J. F.; Hasnain, S. S.; Ingledew, W. J. *FEMS Microbiol. Lett.* **1996**, *137*, 85.
364. Appia-Ayme, C.; Guiliani, N.; Ratouchniak, J.; Bonnefoy, V. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 4781.
365. Giudici-Ortoni, M. T.; Leroy, G.; Nitschke, W.; Bruschi, M. *Biochemistry* **2000**, *39*, 7205.
366. Giudici-Ortoni, M. T.; Guerlesquin, F.; Bruschi, M.; Nitschke, W. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 30365.
367. Abergel, C.; Nitschke, W.; Malarte, G.; Bruschi, M.; Claverie, J. M.; Giudici-Ortoni, M. T. *Structure* **2003**, *11*, 547.
368. Hall, J. F.; Kanbi, L. D.; Harvey, I.; Murphy, L. M. M.; Hasnain, S. S. *Biochemistry* **1998**, *37*, 11451.
369. Shoham, M. *J. Mol. Biol.* **1992**, *227*, 581.
370. Botuyan, M. A.; Toy-Palmer, A.; Chung, J.; Blake, R. C. 2<sup>nd</sup>; Beroza, P.; Case, D. A.; Dyson, H. J. *J. Mol. Biol.* **1996**, *263*, 752.
371. Grossmann, J. G.; Hall, J. F.; Kanbi, L. D.; Hasnain, S. S. *Biochemistry* **2002**, *41*, 3613.
372. Harris, R. K.; Mann, B. E. *NMR and the Periodic Table*; Academic Press: London, 1978.
373. Bertini, I.; Fernández, C. O.; Karlson, B. G.; Leckner, J.; Luchinat, C.; Malmström, B. G.; Nersissian, A. M.; Pierattelli, R.; Shipp, E.; Valentine, J., S.; Vila, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3701.
374. Donaire, A.; Jiménez, B.; Fernández, C. O.; Pierattelli, R.; Niizeki, T.; Moratal, J. M.; Hall, J. F.; Kohzuma, T.; Hasnain, S. S.; Vila, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13698.
375. Hauenstein, B. L.; McMillin, D. R. In *Metal ions in biological systems*; Sigel, H., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1991, p 319.
376. Cowan, J. A. *Inorganic Biochemistry. An introduction*; Second ed.; Wiley-VCH: New York, 1997.
377. Salgado, J.; University of Valencia, 1995.
378. Bonander, N.; Vänngård, T.; Tsai, L. C.; Langer, V.; Nar, H.; Sjölin, L. *Proteins* **1997**, *27*, 385.
379. Moratal, J. M.; Romero, A.; Salgado, J.; Perales-Alarcon, A.; Jiménez, H. R. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *228*, 653.
380. Church, W. B.; Guss, J. M.; Potter, J. J.; Freeman, H. C. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 234.
381. Piccioli, M.; Luchinat, C.; Mizoguchi, T. J.; Ramirez, B. E.; Gray, H. B.; Richards, J. H. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 737.

- 
382. Vila, A. J.; Ramirez, B. E.; Di Bilio, A. J.; Mizoguchi, T. J.; Richards, J. H.; Gray, H. B. *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 4567.
383. Hannan, J. P.; Davy, S. L.; Moore, G. R.; Eady, R. R.; Andrew, C. R. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, *3*, 282.
384. van de Kamp, M.; Silvestrini, M. C.; Brunori, M.; van Beeumen, J.; Hali, F. C.; Canters, G. W. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *194*, 109.
385. Romero, C.; Moratal, J. M.; Donaire, A. *FEBS Lett.* **1998**, *440*, 93.
386. Engeseth, H. R.; McMillin, D. R.; Otvos, J. D. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 4822.
387. Ubbink, M.; Lian, L. Y.; Modi, S.; Evans, P. A.; Bendall, D. S. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *242*, 132.
388. Oz, G.; Pountney, D. L.; Armitage, I. M. *Biochem. Cell Biol.* **1998**, *76*, 223.
389. Utschig, L. M.; Bryson, J. W.; O'Halloran, T. V. *Science* **1995**, *268*, 380.
390. Utschig, L. M.; Baynard, T.; Strong, C.; O'Halloran, T. V. *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 2926.
391. Carafoli, E.; Klee, C., Eds. *Calcium as a cell regulator*; Oxford University Press: New York, 1998.
392. Carafoli, E.; Krebs, J., Eds. *Calcium homeostasis, Topics in biological inorganic chemistry*; Springer-Verlag: Berlin, 2000; Vol. 3.
393. Axelrod, J. *Biochem. Soc. Trans.* **1990**, *18*, 503.
394. Gruia, A. D.; Fischer, S.; Smith, J. C. *Proteins* **2003**, *50*, 507.
395. Sigman, J. A.; Edwards, S. R.; Pabon, A.; Glucksman, M. J.; Wolfson, A. J. *FEBS Lett.* **2003**, *545*, 224.
396. Khanna, N.; Sen, S.; Sharma, H.; Singh, N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *304*, 26.
397. Wu, Y.; He, Y.; Bai, J.; Ji, S. R.; Tucker, W. C.; Chapman, E. R.; Sui, S. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 2082.
398. Yegneswaran, S.; Mesters, R. M.; Griffin, J. H. *J. Biol. Chem.* **2003**, *12*, 12.
399. Nishimoto, S. K.; Waite, J. H.; Nishimoto, M.; Kriwacki, R. W. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 11843.
400. Kretsinger, R. H.; Nockolds, C. E. *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 3313.
401. Chattopadhyaya, R.; Meador, W. E.; Means, A. R.; Quioco, F. A. *J. Mol. Biol.* **1992**, *228*, 1177.
402. Falke, J. J.; Drake, S. K.; Hazard, A. L.; Peersen, O. P. *Q. Rev. Biophys.* **1994**, *27*, 219.
403. Svensson, L. A.; Thulin, E.; Forsén, S. *J. Mol. Biol.* **1992**, *223*, 601.
404. Strynadka, N. C. J.; James, M. N. G. *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, *58*, 951.

405. Bax, A.; Tjandra, N.; Crivici, A.; Ikura, M. In *Calcium as a cell regulator*; Carafoli, E., Klee, C., Eds.; Oxford University Press: New York, 1998, pp 152.
406. Schäfer, B. W.; Heizmann, C. W. *Trends. Biochem. Sci.* **1996**, *21*, 134.
407. Baudier, J.; Glasser, N.; Gerard, D. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 8192.
408. Baudier, J.; Gerard, D. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 8204.
409. Pedrocchi, M.; Schafer, B. W.; Durussel, I.; Cox, J. A.; Heizmann, C. W. *Biochemistry* **1994**, *33*, 6732.
410. Corneliussen, B.; Holm, M.; Waltersson, Y.; Onions, J.; Hallberg, B.; Thornell, A.; Grundstrom, T. *Nature* **1994**, *368*, 760.
411. Walters, J. R.; Howard, A.; Charpin, M. V.; Gniecko, K. C.; Brodin, P.; Thulin, E.; Forsén, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *170*, 603.
412. Szebenyi, D. M. E.; Moffatt, K. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 8761.
413. Kördel, J.; Forsén, S.; Chazin, W. J. *Biochemistry* **1989**, *28*, 7065.
414. Akke, M.; Forsén, S.; Charm, W. S. *J. Mol. Biol.* **1995**, *252*, 102.
415. Andersson, M.; Malmendal, A.; Linse, S.; Ivarsson, I.; Forsén, S.; Svensson, L. A. *Protein Sci.* **1997**, *6*, 1139.
416. Skelton, N. J.; Kördel, J.; Chazin, W. J. *J. Mol. Biol.* **1995**, *249*, 441.
417. Bertini, I.; Cavallaro, G.; Cosenza, M.; Kummerle, R.; Luchinat, C.; Piccioli, M.; Poggi, L. *J. Biomol. NMR* **2002**, *23*, 115.
418. Malmendal, A.; Carlström, G.; Hambraeus, C.; Drakenberg, T.; Forsén, S.; Akke, M. *Biochemistry* **1998**, *37*, 2586.
419. Hofmann, T.; Eng, S.; Lilja, H.; Drakenberg, T.; Vogel, H. J.; Forsén, S. *Eur. J. Biochem.* **1988**, *172*, 307.
420. Chazin, W. J.; Kördel, J.; Drakenberg, T.; Thulin, E.; Brodin, P.; Grundstrom, T.; Forsén, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 2195.
421. Kördel, J.; Forsén, S.; Drakenberg, T.; Chazin, W. J. *Biochemistry* **1990**, *29*, 4400.
422. Carlström, G.; Chazin, W. J. *J. Mol. Biol.* **1993**, *231*, 415.
423. Johansson, C.; Ullner, M.; Drakenberg, T. *Biochemistry* **1993**, *32*, 8429.
424. Reuben, J.; Fiat, D. *J. Chem. Phys.* **1969**, *51*, 4909.
425. Horrocks, J., W.D. In *NMR of paramagnetic molecules*; La Mar, G. N., Horrocks, J., W.D., Holm, R. H., Eds.; Academic Press: New York, 1973, pp 479.

- 
426. Alsaadi, B. M.; Rossotti, F. J. C.; Williams, R. J. P. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1980**, 2147.
427. Ming, L. J. In *Nuclear Magnetic Resonance of Paramagnetic Macromolecules*; La Mar, G. N., Ed.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1994; Vol. 457, pp 245.
428. Lisowski, J.; Sessler, J. L.; Lynch, V.; Mody, T. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 2273.
429. Vogel, H. J.; Forsén, S. *Biol. Magn. Reson.* **1987**, 7, 249.
430. Westlund, P.-O.; Wennerström, H. *J. Magn. Reson.* **1982**, 50, 451.
431. Aramini, J. M.; Vogel, H. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 1988.
432. Wüthrich, K.; Wider, G.; Wagner, G.; Braun, W. *J. Mol. Biol.* **1982**, 155, 311.
433. Güntert, P.; Braun, W.; Wüthrich, K. *J. Mol. Biol.* **1991**, 217, 517.
434. Brünger, A. T. *X-PLOR Manual Version 3.1. A System for X-ray Crystallography and NMR*; Yale University Press: New Haven, CT, 1992.
435. Brünger, A. T.; Nilges, M. *Q. Rev. Biophys.* **1993**, 26, 49.
436. Archer, S. J.; Ikura, M.; Torchia, D. A.; Bax, A. *J. Magn. Reson.* **1991**, 95, 636.
437. Eggenberger, U.; Karimi-Nejad, Y.; Thüring, H.; Rüterjans, H.; Griesinger, C. *J. Biomol. NMR* **1992**, 2, 583.
438. Clubb, R. T.; Thanabal, V.; Wagner, G. *J. Biomol. NMR* **1992**, 2, 203.
439. Wittekind, M. G.; Mueller, L. *J. Magn. Reson. Ser. B* **1993**, 101, 201.
440. Grzesiek, S.; Bax, A. *J. Magn. Reson. Ser. B* **1993**, 102, 103.
441. Vuister, G. W.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 7772.
442. Cordier, F.; Grzesiek, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1601.
443. Vold, R. R.; Prosser, R. S. *J. Magn. Reson. Ser. B* **1996**, 113, 267.
444. Tjandra, N.; Grzesiek, S.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 6264.
445. Tjandra, N.; Omichinski, J. G.; Gronenborn, A. M.; Clore, G. M.; Bax, A. *Nat. Struct. Biol.* **1997**, 4, 732.
446. Bax, A.; Tjandra, N. *J. Biomol. NMR* **1997**, 10, 289.
447. Reif, B.; Hennig, M.; Griesinger, C. *Science* **1997**, 276, 1230.
448. Wishart, D. S.; Sykes, B. D.; Richards, F. M. *J. Mol. Biol.* **1991**, 222, 311.
449. Gagne', R. R.; Tsuda, S.; Li, M. X.; Chandra, M.; Smillie, L. B.; Sykes, B. D. *Protein Sci.* **1994**, 3, 1961.
450. Bertini, I.; Luchinat, C.; Rosato, A. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1996**, 66, 43.

451. Bertini, I.; Luchinat, C.; Piccioli, M. *Methods. Enzymol.* **2001**, *339*, 314.
452. Dunham, S. U.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *107*, 10702.
453. Dunham, S. U.; Turner, C. J.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5395.
454. Ramos, A.; Varani, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10992.
455. Battiste, J. L.; Wagner, G. *Biochemistry* **2000**, *39*, 5355.
456. Gaponenko, V.; Howarth, J. W.; Columbus, L.; Gasmi-Seabrook, G.; Yuan, J.; Hubbell, W. L.; Rosevear, P. R. *Protein. Sci.* **2000**, *9*, 302.
457. Bertini, I.; Capozzi, F.; Luchinat, C.; Piccioli, M.; Vila, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 651.
458. Bertini, I.; Couture, M. M.; Donaire, A.; Eltis, L. D.; Felli, I. C.; Luchinat, C.; Piccioli, M.; Rosato, A. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *241*, 440.
459. Bertini, I.; Luchinat, C.; Parigi, G.; Walker, F. A. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*, 515.
460. Sakellariou, D.; Brown, S. P.; Lesage, A.; Hediger, S.; Bardet, M.; Meriles, C. A.; Pines, A.; Emsley, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4376.
461. Bertini, I.; Longinetti, M.; Luchinat, C.; Parigi, G.; Sgheri, L. *J. Biomol. NMR* **2002**, *22*, 123.
462. Lukin, J. A.; Kontaxis, G.; Simplaceanu, V.; Yuan, Y.; Bax, A.; Ho, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 517.
463. Tjandra, N.; Bax, A. *J. Magn. Reson.* **1997**, *124*, 512.
464. Prestegard, J. H. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 517.
465. Arnesano, F.; Banci, L.; Bertini, I.; van Der Wetering, K.; Czisch, M.; Kaptein, R. *J. Biomol. NMR* **2000**, *17*, 295.
466. Trempe, J. F.; Morin, F. G.; Xia, Z.; Marchessault, R. H.; Gehrin, K. *J. Biomol. NMR* **2002**, *22*, 83.
467. Tjandra, N.; Bax, A. *Science* **1997**, *278*, 1111.
468. Sass, J.; Cordier, F.; Hoffman, A.; Rogowski, M.; Cousin, A.; Omichinski, J. G.; Grzesiek, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*.
469. Bernadó, P.; Barbieri, R.; Padrós, E.; Luchinat, C.; Pons, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 374.
470. Clore, G. M.; Starich, M. R.; Gronenborn, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10571.
471. Arnesano, F.; Banci, L.; Bertini, I.; Huffman, D. L.; O'Halloran, T. V. *Biochemistry* **2001**, *40*, 1528.
472. Guéron, M.; Leroy, J. L.; Griffey, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 7262.

- 
473. Goldman, M. *J. Magn. Reson.* **1984**, *60*, 437.
474. van Zijl, P. C. M.; Ruessink, B. H.; Bulthuis, J.; Maclean, C. *Acc. Chem. Res.* **1984**, *17*, 172.
475. Engelke, J.; Rüterjans, H. *J. Biomol. NMR* **1997**, *9*, 63.
476. Mandel, A. M.; Akke, M.; Palmer, A. G. *3<sup>rd</sup> J. Mol. Biol.* **1995**, *246*, 144.
477. Palmer, A. G. *3<sup>rd</sup>*; Kroenke, C. D.; Loria, J. P. *Methods. Enzymol.* **2001**, *339*, 204.
478. Lipari, G.; Szabo, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 4546.
479. Lipari, G.; Szabo, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 4559.
480. Palmer, A. G. *3<sup>rd</sup>*; Rance, M.; Wright, J. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4371.
481. Devore, J. *Probability and Statistics for Engineering and the Sciences*; Brooks/Cole Publishing Company: Monterey, 1982.
482. Bevington, P. R.; Robinson, D. K. *Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences*; McGraw-Hill, Inc.: New York, 1992.
483. Clore, G. M.; Driscoll, P. C.; Wingfield, P. T.; Gronenborn, A. M. *Biochemistry* **1990**, *29*, 7387.
484. Davis, D. G.; Perlman, M. E.; London, R. E. *J. Magn. Reson. B* **1994**, *104*, 266.
485. Loria, J. P.; Rance, M.; Palmer, A. G. *3<sup>rd</sup> J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2331.
486. Millet, O.; Loria, J. P.; Kroenke, C. D.; Pons, M.; Palmer, A. G. *3<sup>rd</sup> J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2867.
487. Akke, M.; Palmer, A. G. *3<sup>rd</sup> J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 911.
488. Zinn-Justin, S.; Berthault, P.; Guenneugues, M.; Desvaux, H. *J. Biomol. NMR* **1997**, *10*, 363.
489. Luz, Z.; Meiboom, S. *J. Chem. Phys.* **1963**, *39*, 366.
490. Tjandra, N.; Szabo, A.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6986.
491. Hall, J. F.; Kanbi, L. D.; Strange, R. W.; Hasnain, S. S. *Biochemistry* **1999**, *38*, 12675.
492. Johansson, C.; Brodin, P.; Grundstrom, T.; Thulin, E.; Forsén, S.; Drakenberg, T. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *187*, 455.
493. Bertini, I.; Ciurli, S.; Dikiy, A.; Luchinat, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12020.
494. Hore, P. J. *J. Magn. Reson.* **1983**, *54*, 539.
495. Piotto, M.; Saudek, V.; Sklenar, V. *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 661.
496. Vold, R. L.; Waugh, J. S.; Klein, M. P.; Phelps, D. E. *J. Chem. Phys.* **1969**, *48*, 3831.
497. Kumar, A.; Wagner, G.; Ernst, R. R.; Wüthrich, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *96*, 1156.



498. Keeler, J.; Neuhaus, D. *J. Magn. Reson.* **1985**, *63*, 454.
499. Kay, L. E.; Ikura, M.; Tschudin, R.; Bax, A. *J. Magn. Reson.* **1990**, *89*, 496.
500. Oh, B.-H.; Westler, W. M.; Markley, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3083.
501. Kay, L. E.; Xu, G.-Y.; Singer, A. U.; Muhandiram, D. R.; Forman-Kay, J. D. *J. Magn. Reson. Ser. B* **1993**, *101*, 333.
502. Peng, J. W.; Wagner, G. *Methods. Enzymol.* **1994**, *239*, 563.
503. Kay, L. E.; Nicholson, L. K.; Delaglio, F.; Bax, A.; Torchia, D. A. *J. Magn. Reson.* **1992**, *97*, 359.
504. Grzesiek, S.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12593.
505. Sklenar, V.; Bax, A. *J. Magn. Reson.* **1987**, *74*, 469.
506. Hwang, T.-L.; van Zijl, P. C. M.; Mori, S. *J. Biomol. NMR* **1998**, *11*, 221.
507. Jeener, J.; Meier, B. H.; Bachmann, P.; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4546.
508. Bothner-By, A. A.; Stephens, R. L.; Lee, J.; Warren, C. D.; Jeanloz, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 811.
509. Bax, A.; Davis, D. G. *J. Magn. Reson.* **1985**, *63*, 207.
510. Mori, S.; Abeygunawardana, C.; Johnson, M. O.; van Zijl, P. C. M. *J. Magn. Reson. Ser. B* **1995**, *108*, 94.
511. Dalvit, C. *J. Magn. Reson. Ser. B* **1996**, *112*, 282.
512. Hunt, A. H.; Toy-Palmer, A.; Cavanagh, J.; Blake, R. C. 2<sup>nd</sup>; Dyson, H. J. *J. Mol. Biol.* **1994**, *244*, 370.
513. Eccles, C.; Güntert, P.; Billeter, M.; Wüthrich, K. *J. Biomol. NMR* **1991**, *1*, 111.
514. Borgias, B.; Thomas, P. D.; James, T. L. *COmplete Relaxation Matrix Analysis (CORMA)*, University of California, San Francisco, 1989.
515. Bertini, I.; Donaire, A.; Felli, I. C.; Luchinat, C.; Rosato, A. *Magn. Reson. Chem.* **1996**, *34*, 948.
516. Sayle, R. *RASMOL*; Biomolecular Structure Department, Glaxo Research and Development: Greenford, Middlesex, UK, 1994.
517. Koradi, R.; Billeter, M.; Wüthrich, K. *J. Mol. Graphics* **1996**, *14*, 51.
518. Laskowski, R. A.; Rullmann, J. A. C.; MacArthur, M. W.; Kaptein, R.; Thornton, J. M. *J. Biomol. NMR* **1996**, *8*, 477.
519. Lee, L. K.; Rance, M.; Chazin, W. J.; Palmer, A. G. 3<sup>rd</sup> *J. Biomol. NMR* **1997**, *9*, 287.
520. Tjandra, N.; Feller, S. E.; Pastor, R. W.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12562.

- 
521. Sheppard, S. K.; Eaton, G. R.; Eaton, S. S. *Inorg. Chem.* **1989**, *28*, 4496.
522. Wu, F. J.; Kurtz, D. M., Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6563.
523. Karplus, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870.
524. Bertini, I.; Donaire, A.; Feinberg, B. A.; Luchinat, C.; Piccioli, M.; Yuan, H. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *232*, 192.
525. Huber, J. G.; Gaillard, J.; Moulis, J.-M. *Biochemistry* **1995**, *34*, 194.
526. Olsson, M. H.; Hong, G.; Warshel, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5025.
527. Solomon, E. I.; Penfield, K. W.; Gewirth, A. A.; Lowery, M. D.; Shadle, S. E.; Guckert, G. A.; LaCroix, L. B. *Inorg. Chim. Acta* **1996**, *243*, 67.
528. Wittung-Stafshede, P.; Hill, M. G.; Gómez, E.; Di Bilio, A. J.; Karlson, B. G.; Leckner, J.; Winkler, J. R.; Gray, H. B.; Malmström, B. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, *3*, 367.
529. Langen, R.; Jensen, G. M.; Jacob, U.; Stephen, P. J.; Warshel, A. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 25625.
530. Bertini, I.; Gaudemer, A.; Luchinat, C.; Piccioli, M. *Biochemistry* **1993**, *32*, 12887.
531. Roberts, J. E.; Cline, J. F.; Lum, V.; Freeman, H.; Gray, H. B.; Peisach, J.; Reinhammar, B.; Hoffman, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 5324.
532. Werst, M. W.; Davoust, C. E.; Hoffman, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1533.
533. Coremans, J. W. A.; van Gastel, M.; Poluektov, O. G.; Groenen, E. J.; Blaauwen, T.; van Pouderooyen, G.; Canters, G. W.; Nar, H.; Hammann, C.; Messerschmidt, A. *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *235*, 202.
534. Bertini, I.; Bryant, D. A.; Ciurli, S.; Dikiy, A.; Fernández, C. O.; Luchinat, C.; Safarov, N.; Vila, A. J.; Zhao, J. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 47217.
535. Lu, Y.; LaCroix, L. B.; Lowery, M. D.; Solomon, E. I.; Bender, C. J.; Peisach, J.; Roe, J. A.; Gralla, E. B.; Valentine, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5907.
536. Pierloot, K.; De Kerpel, J. A. O.; Ryde, U.; Olsson, M. H.; Roos, B. O. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13156.
537. Kalverda, A. P.; Ubbink, M.; Gilardi, G.; Wijmenga, S. S.; Crawford, A.; Jeuken, L. J.; Canters, G. W. *Biochemistry* **1999**, *38*, 12690.
538. Reader, J. S.; van Nuland, N. A.; Thompson, G. S.; Ferguson, S. J.; Dobson, C. M.; Radford, S. E. *Protein Sci.* **2001**, *10*, 1216.
539. Buning, C.; Canters, G. W.; Comba, P.; Dennison, C.; Jeuken, L.; Melter, M.; Sanders-Loehr, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 204.

540. Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Canters, G. W.; de Waal, E. C.; Loschi, L.; Warmerdam, G. C. M.; Sola, M. *Biochemistry* **2001**, *40*, 6707.
541. Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Loschi, L.; Menziani, M. C.; De Rienzo, F.; Sola, M. *Biochemistry* **2001**, *40*, 6422.
542. Blake, R. C. 2<sup>nd</sup>; White, K. J.; Shute, E. A. *Biochemistry* **1991**, *30*, 9443.
543. Kanbi, L. D.; Antonyuk, S.; Hough, M. A.; Hall, J. F.; Dodd, F. E.; Hasnain, S. S. *J. Mol. Biol.* **2002**, *320*, 263.
544. Hough, M. A.; Hall, J. F.; Kanbi, L. D.; Hasnain, S. S. *Acta Cryst. D* **2001**, *57*, 355.
545. Romero, A.; Hoitink, C. W. G.; Nar, H.; Huber, R.; Messerschmidt, A.; Canters, G. W. *J. Mol. Biol.* **1993**, *229*, 1007.
546. Romero, A.; Hoitink, C. W.; Nar, H.; Huber, R.; Messerschmidt, A.; Canters, G. W. *J. Mol. Biol.* **1993**, *229*, 1007.
547. Thompson, G. S.; Leung, Y. C.; Ferguson, S. J.; Radford, S. E.; Redfield, C. *Protein Sci.* **2000**, *9*, 846.
548. Toy-Palmer, A.; Prytulla, S.; Dyson, H. J. *FEBS Lett.* **1995**, *365*, 35.
549. Kay, L. E.; Torchia, D. A.; Bax, A. *Biochemistry* **1989**, *28*, 8972.
550. Campos-Olivas, R.; Summers, M. F. *Biochemistry* **1999**, *38*, 10262.
551. Banci, L.; Bertini, I.; Cramaro, F.; Del Conte, R.; Rosato, A.; Viezzoli, M. S. *Biochemistry* **2000**, *39*, 9108.
552. Fushman, D.; Cowburn, D. In *Methods in enzymology*; James, T. L., Dötsch, V., Schmitz, U., Eds.; Academic Press: San Francisco, 2001; Vol. 339, pp 109.
553. Nar, H.; Messerschmidt, A.; Huber, R.; van de Kamp, M.; Canters, G. W. *J. Mol. Biol.* **1991**, *218*, 427.
554. Dalvit, C.; Hommel, U. *J. Magn. Reson. Ser. B* **1995**, *109*, 334.
555. Bertini, I.; Huber, J. G.; Luchinat, C.; Piccioli, M. *J. Magn. Reson.* **2000**, *147*, 1.
556. Grossmann, J. G.; Ingledew, W. J.; Harvey, I.; Strange, R. W.; Hasnain, S. S. *Biochemistry* **1995**, *34*, 8406.
557. Barker, P. D.; Bertini, I.; Del Conte, R.; Ferguson, S. J.; Hajjeva, P.; Tomlinson, E.; Turano, P.; Viezzoli, M. S. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 4468.
558. Güntert, P.; Wüthrich, K. *J. Biomol. NMR* **1991**, *1*, 447.
559. van der Vaart, A.; Merz, K. M., Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9182.
560. Bertini, I.; Luchinat, C.; Turano, P. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 761.

561. Kragelund, B. B.; Jönsson, M.; Bifulco, G.; Chazin, W. J.; Nilsson, A.; Finn, B. E.; Linse, S. *Biochemistry* **1998**, *37*, 8926.
562. Julenius, K.; Thulin, E.; Linse, S.; Finn, B. E. *Biochemistry* **1998**, *37*, 8915.
563. Bertini, I.; Carrano, C. J.; Luchinat, C.; Piccioli, M.; Poggi, L. *Biochemistry* **2002**, *41*, 5104.
564. Ishima, R.; Torchia, D. A. *Nature Struct. Biol.* **2000**, *7*, 740.

## VIII. Artículos



En la Tabla siguiente especificamos los trabajos publicados o en proceso de publicación y los Capítulos de la Tesis con los que se corresponden. A continuación se incluyen los artículos ya publicados.

<i>Capítulo de Resultados</i>	<i>Publicación</i>
1. Estudio de la Rusticianina de Cobalto(II) mediante RMN de <sup>1</sup> H	<i>Biochemistry</i> , <b>2001</b> , 40, 837-846.
2. Estudio de la Rusticianina de Cobre(II) a 800 MHz	<i>J. Am. Chem. Soc.</i> , <b>2002</b> , 124, 13698-13708.
3. Mutantes de la Metionina Axial en Rusticianina	Artículo en preparación.
4. Dinámica e Hidratación de la Rusticianina <sup>a</sup>	<i>Biochemistry</i> , <b>2003</b> , 42, 10396-10405. Capítulo del libro: <i>Methods in Proteome and Protein Analysis</i> ; Kamp, R.M., Calvete, J., Choli-Papadopoulou, T., Eds.; Springer-Verlag; <i>en prensa</i> , 2004, pp 15-33.
5. Estructura de CaCeCb: Relevancia de las Restricciones Paramagnéticas	<i>Journal of Biomolecular NMR</i> , <b>2001</b> , 21, 85-98.
6. Estudios de Despliegamiento Incipiente de la Calbindina D <sub>9k</sub>	<i>Biochemistry</i> , <b>2003</b> , 42, 13066-13073.

<sup>a</sup> A partir del estudio de movilidad que se describe en este Capítulo de la Tesis, hemos escrito un artículo y un capítulo de un libro. El capítulo del libro es principalmente metodológico, mientras los resultados se incluyen en el artículo publicado.

# Electronic Characterization of the Oxidized State of the Blue Copper Protein Rusticyanin by $^1\text{H}$ NMR: Is the Axial Methionine the Dominant Influence for the High Redox Potential?<sup>†</sup>

Antonio Donaire,<sup>\*,‡</sup> Beatriz Jiménez,<sup>‡</sup> José-María Moratal,<sup>§</sup> John F. Hall,<sup>||</sup> and S. Samar Hasnain<sup>||,⊥</sup>

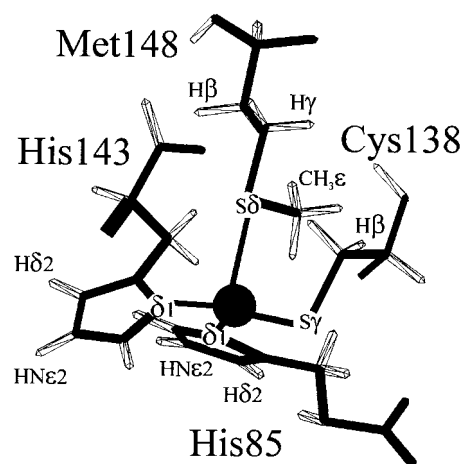
Departamento de Ciencias Químicas, Universidad Cardenal Herrera-CEU, Avda, Seminario s/n, 46113-Montcada, Valencia, Spain, Departamento de Química Inorgánica, Universitat de Valencia, C/Dr. Moliner, 50, 46100-Burjassot, Valencia, Spain, The Cell Signalling Laboratory, Department of Biological Sciences, De Monfort University, The Gateway, Leicester LE1 9BH, U.K., and CCLRC Daresbury Laboratory, Warrington, Cheshire WA4 4AD, U.K.

Received August 18, 2000; Revised Manuscript Received October 30, 2000

**ABSTRACT:** The oxidized state of rusticyanin, the blue copper protein with the highest redox potential in its class, has been investigated through  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance applied to its cobalt(II) derivative. The assignment of the protons belonging to the coordinated residues has been performed. Many other amino acids situated in the vicinity of the metal ion, including six hydrophobic residues (isoleucine140 and five phenylalanines) have also been identified. The orientation of the main axes of the magnetic susceptibility tensor for the cobalt(II)-rusticyanin as well as its axial,  $\Delta\chi_{ax}$ , and rhombic,  $\Delta\chi_{rh}$ , magnetic susceptibility anisotropy components have been determined. A comparison of the present results with those previously obtained for cobalt(II)azurin [Donaire, A., Salgado, J., Moratal, J. M. (1998) *Biochemistry* 37, 8659–8673] allows us to provide further insights into the reasons for the high redox potential of this protein. According to our results, the interaction between the metal ion and the thioether S $\delta$  of the axial methionine is not as influential as the strong destabilizing effect that the hydrophobic residues close to the metal ion undergo in the oxidized state.

Blue copper proteins (BCPs hereafter)<sup>1</sup> are a subclass of the copper proteins family containing analogous functional, structural, and spectroscopic features (1–5). All BCPs participate in electron transfer processes where the copper ion changes from a diamagnetic, Cu(I), to a paramagnetic, Cu(II), oxidation state. While halocyanin and auracyanin are proteins partially bound to the membrane, the rest of them are cytoplasmic or periplasmic soluble proteins. The molecular masses of all of them are in the range from 10 to 18 kDa.

The copper(II) ion in these centers presents two singular characteristics (6): an anomalously small parallel hyperfine coupling constant ( $A_{||}$ ) and a very strong absorption band at ca. 600 nm, that gives these proteins their typical color. These singular features are due to a strong coordination between the copper ion and a sulfur cysteinyl atom. The metal ion coordination sphere is completed with two imidazol nitrogens



**FIGURE 1:** Coordination sphere of the copper ion in BCPs. In stellacyanin, the axial methionine is replaced by a glutamine. In azurin, there is another axial ligand (a carbonyl of the backbone) as a fifth ligand. The numeration of the residues refers to rusticyanin. The heavy atoms are drawn in black, while protons are displayed shadowed.

from two histidines, disposed in an equatorial position, and with a sulfur thioether of a methionine in an axial position (Figure 1) (7). This S $\delta$ Met atom is more weakly bound than the equatorial donor atoms, and it is replaced by a glutamine in stellacyanin and a leucine in laccase (8–10). In azurin, an axially and weakly bound oxygen belonging to a carbonyl group becomes a fifth ligand (11). The Cu–S $\gamma$  bond (S $\gamma$  of the equatorial Cys) is primarily responsible for the spectroscopic features of the copper(II) ion (6). In turn, the strength

<sup>†</sup> This work has been supported with financial aid from the DGICYT-Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (PB98-1444).

\* Corresponding author: Dr. Antonio Donaire, Departamento de Ciencias Químicas, Universidad Cardenal Herrera-CEU, Avda Seminario s/n, 46113-Montcada, Valencia, Spain. Phone: 34 96 1369000; fax: 34 96 1395272; e-mail: donaire@uv.es.

<sup>‡</sup> Universidad Cardenal Herrera-CEU.

<sup>§</sup> Universitat de Valencia.

<sup>||</sup> De Monfort University.

<sup>⊥</sup> CCLRC Daresbury Laboratory.

<sup>1</sup> Abbreviations: NMR, nuclear magnetic resonance; BCPs, blue copper proteins; Rc, rusticyanin; CoRc, cobalt(II) rusticyanin; TOCSY, total correlation spectroscopy; NOESY, nuclear Overhauser effect spectroscopy; Az, azurin; St, stellacyanin; Am, amicyanin; PsAz, pseudoazurin; PDB, protein data bank.



of this interaction seems to be modulated by the Cu–S $\delta$  (S $\delta$  of the axial methionine) connection.

Concomitantly with the singular spectroscopic features of the paramagnetic copper(II) ion, the environment of copper in BCPs stabilizes the diamagnetic Cu(I) state versus the paramagnetic, Cu(II), oxidation state. Thus, the redox potentials of these proteins are higher than that one exhibited by the Cu(II)/Cu(I) pair in aqueous solution. It has been proposed that the destabilization of copper(II) arises from an atypical coordination of the copper in the active site that, in turn, must facilitate the oxidation/redox process. This is the basis for the so-called “entatic state” hypothesis proposed by Malmström at the beginning of the sixties (12, 13), according to which a maximum of energy in the surroundings of the active site can be achieved due to the global folding of the protein. This idea is now widely accepted and interpreted in the sense that the copper(II) electronic structure is completely dependent on the architecture of the active center. The strained coordination of copper(II) is then considered responsible for the high redox potentials not only in BCPs but also in copper-A centers (4). However, the relative influence of the factors that contribute to the final destabilization of the oxidized state have not been precisely determined.

Rusticyanin (Rc, hereafter) is the BCP with the highest redox potential, 680 mV (14–16). It is present in the gram-negative bacterium *Thiobacillus ferrooxidans* (*Tf*) (17, 18). This organism lives in extremely acidic media (at pH values lower than 2.5), capturing the electrons for its energy processes from the oxidation of Fe(II) to Fe(III). Rusticyanin is the most abundant protein in *Tf*, constituting the 6.5% of the total protein weight. This BCP has been proposed as the last donor of electrons to the Fe(III) in the electron-transfer chain. The three-dimensional structure of Rc has been resolved both in solid state (19–21) and in solution by NMR (22). The copper ion in Rc shows the characteristic coordination described above for all BCPs. A feature of Rc as revealed by the three-dimensional structure and may be highly relevant in terms of the extreme properties of this protein is the presence of several hydrophobic groups (an isoleucine and several phenylalanines) in the vicinity of the metal ion. We have recently studied the influence of the axial ligand methionine on the redox potential of Rc by site-directed mutagenesis (23). The substitution of this amino acid changes not only the spectroscopic properties but also the redox potential of the protein by  $\pm 120$  mV.

Nuclear magnetic resonance applied to paramagnetic molecules has been demonstrated to be a very powerful technique for obtaining structural and electronic information from the active center of BCPs (24–29). The long electronic relaxation times of the Cu(II) ion ( $10^{-9}$  s) produce very short relaxation times in protons close to it. Consequently, the broadened of the signals prevent, in most cases, their observation. Since copper(II),  $S = 1/2$ , does not show Curie relaxation, high magnetic fields (as high as 800 MHz) have recently been used to study the native oxidized protein (27, 28). An alternative approach is the metal substitution of the copper(II) ion by other transition metal ions, preferably Co(II) and Ni(II) (29–34). This approach has the advantage of obtaining information not only of the ligand residues of the metal ion but also of residues close, but not coordinated, to

it. The hyperfine shift ( $\delta_{\text{hyp}}$ ), which arises from the interaction between the nuclear and the unpaired electronic spins, contains very useful information on the electronic structure of the metal ion (35). This interaction produces two kinds of contributions to the hyperfine (so-called “isotropic”) shift, i.e.,

$$\delta_{\text{hyp}} = \delta_{\text{con}} + \delta_{\text{dip}} \quad (1)$$

where  $\delta_{\text{con}}$  (the contact or Fermi contribution) is due to the direct unpaired spin density that resides on the resonating nucleus and is transmitted through covalent bonds.  $\delta_{\text{dip}}$  (the dipolar or pseudocontact contribution) is due to the dipolar interaction between the magnetic moments of the unpaired electronic spin and the resonating nucleus. This last contribution is low in systems with low magnetic anisotropy, such as copper(II) complexes. Hence, in the native oxidized protein, this information is usually lost. In contrast, for cobalt(II) derivatives of BCPs, where there are usually high levels of magnetic anisotropy (30, 36), relevant information can be extracted from the dipolar contributions. This approach has been exploited in cobalt(II) azurin (37).

Here we present a  $^1\text{H}$  NMR study of the cobalt(II) derivative of rusticyanin. Most of the hyperfine shifted signals with both contact and pseudo-contact contribution (i.e., those of the protons of the ligands of the metal ion) or with only pseudocontact contribution (i.e., those of the protons of residues close, but not bound, to the metal ion) have been assigned. The orientation and the axial,  $\Delta\chi_{\text{ax}}$ , and rhombic,  $\Delta\chi_{\text{rh}}$ , components of the magnetic susceptibility tensor anisotropy have been determined with the aim of providing a detailed molecular and electronic structure of rusticyanin and to compare the present results with those obtained for analogous systems with lower redox potentials, such as azurin, plastocyanin, pseudoazurin, or stellacyanin. We provide new information on the factors that determine the high redox potential of this protein.

## MATERIALS AND METHODS

**Extraction and Purification of Rusticyanin.** Recombinant rusticyanin was obtained from *Escherichia coli* strains BL21-(DE3) cultures. The growth and expression of the protein was carried out as previously described (38). The purification procedure was followed as described elsewhere (39), except for the fact that no copper(II) ion was added to the samples. To measure the degree of purity in the diverse steps of the purification, copper was added to an aliquot of the extract and oxidized with potassium ferricyanide. The ratio A592/A280 was taken as a purity index, considering a value of 7.1 as optimum (the A280 value was measured before adding either copper or potassium ferricyanide to the sample). Typically, around 70–80 milligrams of protein were obtained for a culture liter.

**Sample Preparation.** To obtain the cobalt derivative, the solution containing the apoprotein was diluted up to ca.  $5 \times 10^{-5}$  M, and the pH was set at a value around 6.0–6.5. The buffer was sodium acetate 0.1 M. Cobalt(II) was added to obtain a final molar apoprotein:cobalt(II) ratio concentrations of about 1:20. Two or three days stirring at room temperature were enough to metalate more than the 90% of the apoprotein. Cobalt(II) rusticyanin (CoRc) samples were concentrated

in Millipore centricon devices. The NMR samples were typically 3–4 mM in protein (acetate buffer 0.1 M, pH 6.0).

**NMR Experiments.** NMR experiments were performed either in a Varian Unity400 operating at 400 MHz or in a Bruker Avance DRX500 spectrometer operating at 500 MHz. One-dimensional  $^1\text{H}$  NMR experiments were performed either by using the superweft (d1-P180-d2-P90-AQ) (40) or the invsuperweft (d1-P180-d2-P180-d3-p90-AQ) pulse sequences. In this new pulse sequence (invsuperweft), there is one more degree of freedom than in the superweft sequence; thus, it is possible to select more adequately the three delays (Aq plus d1, d2 and d3), and then a better filter for protons with a determined  $T_1$  can be achieved. This new pulse sequence has three substantial advantages. First, as the acquisition time can be longer than that used in the superweft sequence, a better resolution can be obtained. This point is specially relevant to observe protons that resonate in the so-called “pseudo-diamagnetic” region, i.e., between –10 and 20 ppm. Second, as the acquisition and the recycle times are longer than they are in the superweft sequence, the dispersion of the observed baseline is lower. Finally, if the three delays are properly chosen, a large number of protons within a large range of  $T_1$  values can be filtered. This includes the water protons, which can be more effectively eliminated with this pulse sequence than with the original superweft sequence. Typical values of 4, 142, 50, and 82 ms for the d1, the d2, the d3, and the acquisition times were used. This allows us to completely eliminate protons with  $T_1$  values higher than 100 ms.

Transversal relaxation times were obtained measuring the line broadening of the signals at half-height through the relationship  $T_2^{-1} = \pi\Delta\nu_{1/2}$ . Longitudinal relaxation times were obtained by using the inversion–recovery pulse sequence (d1-P180-d2-AQ) (41). The signal intensities were fitted to a simple exponential equation by using three parameters. 1D steady-state NOE experiments were carried out with the superweft sequence by applying, during the d2 (see above), a radio frequency on the signal of interest and interleaving the same number of scans irradiating close to, but not on, (off) the same signal, as previously described (42,43). The saturation delay was, in all cases, 40 ms. Weft-NOESY and weft-TOCSY experiments (44) (d1-P180-d2-NOESY and d1-P180-d2-TOCSY pulse sequence, respectively) performed in conditions to observe fast relaxing and hyperfine shifted signals were also carried out. All parameters of these experiments related with the chemical shifts, the couplings, and the acquisition times were adjusted according to the  $T_2$  values of the observed signals, while those parameters related with dipolar couplings (mixing time in NOESY experiments) were fitted according to the  $T_1$  of the signals, as previously described (45, 46). NOESY mixing times were included in the 2–25 millisecond range.

**Magnetic Susceptibility Tensor.** The pseudocontact contribution to the chemical shift (eq 1) arises from the magnetic anisotropy of the system. If we assumed the metal-center point dipole approximation (35, 36), it can be related with the magnetic susceptibility tensor by the expression:

$$\delta^{\text{pc}} = \frac{1}{12\pi^3} \left[ \Delta\chi_{\text{ax}}(3\cos^2\theta - 1) + \frac{3}{2}\Delta\chi_{\text{rh}} \sin^2\theta \cos 2\phi \right] \quad (2)$$

where  $r$ ,  $\theta$ , and  $\phi$  are the spherical polar coordinates of a proton relative to the principal coordinates of the  $\chi$  tensor. The axial,  $\Delta\chi_{\text{ax}}$ , and rhombic,  $\Delta\chi_{\text{rh}}$ , magnetic susceptibility anisotropy values are given by

$$\Delta\chi_{\text{ax}} = \chi_{zz} - \frac{1}{2}(\chi_{xx} + \chi_{yy}) \quad (3)$$

and

$$\Delta\chi_{\text{rh}} = \chi_{xx} - \chi_{yy} \quad (4)$$

In turn,  $\chi_{xx}$ ,  $\chi_{yy}$ , and  $\chi_{zz}$  are the magnitudes of the principal components of the magnetic susceptibility tensor. If we have a set of signals corresponding to protons with only pseudocontact contribution, i.e., belonging to residues close, but not coordinated, to the metal ion, it is possible to determine the orientation and the axial and rhombic magnetic susceptibility anisotropy values. The methodology followed in the determination of the orientation and magnitude of the components of the magnetic susceptibility tensor in cobalt(II) rusticyanin is completely analogous to that previously followed for cobalt(II) azurin, extensively explained in ref 37. The program Fantasia (47), generously provided by Prof. Bertini (University of Florence, Italy), was applied. The diamagnetic contribution to the chemical shift was extracted from the previously reported assignment corresponding to Cu(I)Rc (48). This assignment was performed at pH 3.4, while in the present study the measurements have been carried out at pH 6.0. The difference in chemical shifts in Cu(I)Rc between these two conditions is minimal, as authors have checked for amide protons (lower than 0.10 ppm for all protons, data not shown). The observed hyperfine shift ranged from 2 to 3 orders of magnitude larger than this value, i.e., the committed error is completely negligible. The coordinates of rusticyanin were obtained from the pdbfiles pdba3z.ent and pdb1a8z.ent, corresponding to rusticyanin crystal structures determined by X-ray diffraction at 1.90 Å of resolution (20, 21).

## RESULTS AND DISCUSSION

**NMR Assignments.** The  $^1\text{H}$  NMR spectrum of CoRc (3.5 mM, acetate buffer 0.1 M, pH 6.0) recorded with the invsuperweft pulse sequence is displayed in Figure 2. Table 1 presents a resume of the NMR parameters (hyperfine shifts, and relaxation rates) of these fast relaxing signals, as well as their assignment. These assignments were done on the basis of the dipole–dipole interaction observed in the 1D NOE and 2D NOESY experiments together with the expected distances obtained from the X-ray and solution structures (19–22). In Figure 3, panels A–H, the 1D NOE of the most hyperfine shifted signals (b, d–i, and v) are shown.

(a) **Assignments of the Ligand Residues.** The exchangeable downfield-shifted signals f and g have contact contribution, i.e., belong to residues coordinated to the cobalt(II) ion (Figure 1). Thus, they necessarily correspond to the  $\text{NH}\epsilon 2$  of the coordinated histidines. The intensity of the signal f decreases when the temperature increases, indicating that the corresponding protons exchange with the solvent at high temperatures. Hence, this proton belongs to the most exposed histidine, i.e., His143. This pattern is completely analogous to the other cobalt-substituted BCPs studied by NMR (8,

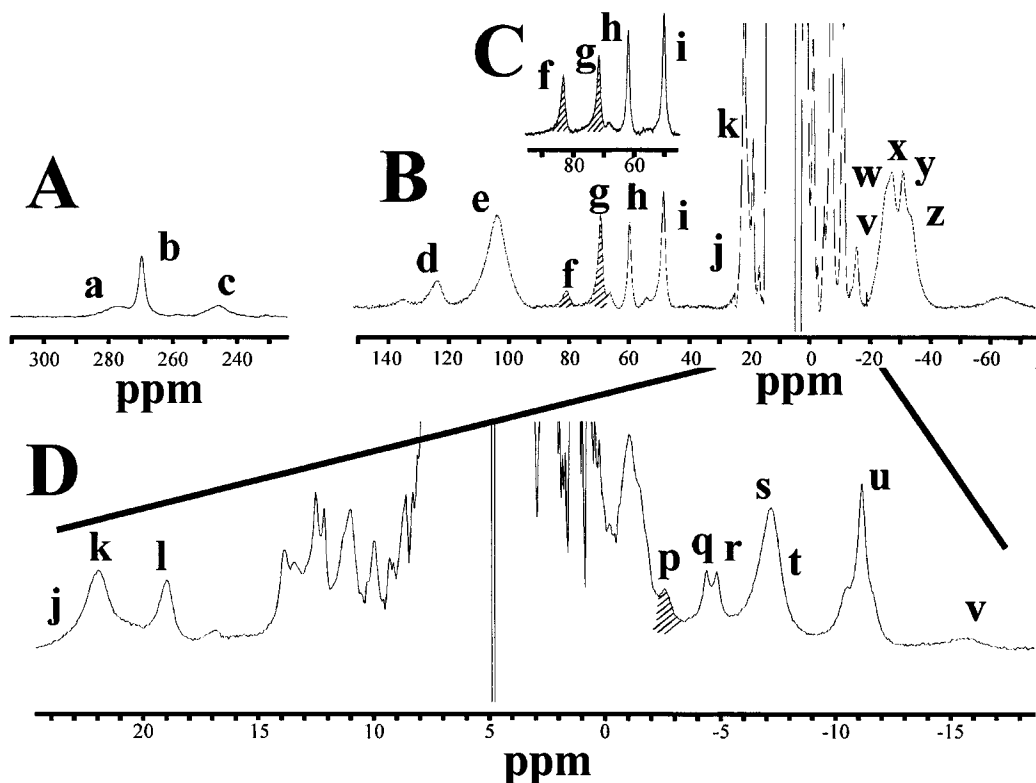


FIGURE 2:  $^1\text{H}$  NMR spectrum of CoRc in acetate buffer 0.1 M, at pH 6.0 and 20  $^\circ\text{C}$ . (A) Far downfield (300–220 ppm) shifted region of the spectrum showing Cys138H $\beta$  and Met148H $\gamma$ 2 protons; (B) region of the spectrum displaying the rest of the signals with contact contribution; (C) CoRc  $^1\text{H}$  NMR spectrum at 5  $^\circ\text{C}$ ; (D) expansion of the so-called “pseudo-diamagnetic” (20 to  $-15$  ppm) part of the spectrum.

25, 33, 49–51). When signal f is saturated (see Figure 3, panel D) an NOE on the signal i, among others, is observed. This permits the assignment of signal i as due to His143H $\delta$ 2. The other exchangeable signal g gives NOE with signal h (Figure 3, panel E). This allows us to assign both signals, g and h, as the H $\epsilon$ 2 and H $\delta$ 2 of the coordinated His85, respectively (Figure 1). Moreover, signal v is given NOE with signal h (Figure 3, panels F and H). According to the crystal structure, this signal can be assigned to His85H $\beta$ 1. The HN peptide protons of both histidines are assigned from the strong NOEs that both HisH $\delta$ 2 protons (signals h and i) are given with their respective exchangeable amide protons (see Figure 3, panels F and G).

As signal e, at 103.3 ppm, has an area that is three times that of any other peaks, it is immediately assigned to the methyl Met148CH $3\epsilon$ . Signals a, b, and c are extremely downfield shifted. This strong contact contribution is only possible for Cys138H $\beta$  or MetH $\gamma$  protons (see Figure 1). According to both crystal and solution Rc structures and to the observed  $T_1$  and  $T_2$  values signal b should correspond to one of the Met148H $\gamma$  protons. This is completely confirmed by the NOE experiments. In fact, this signal gives NOE with signal d (Figure 3, panel A), and thus it has to correspond to its geminal proton. Signal b also gives NOE with signals y and r (Figure 3, panel A). In turn, signal d is giving NOE with the signals r, w, and y (Figure 3, panel B). Finally, the signals r, w, and y give dipolar connectivities among them in the NOESY experiments with very short mixing times (see Supporting Information). From these experiments, it is concluded that all these signals should correspond to the same spin system, i.e., Met148. The stereospecific assignment given in Table 1 is also deduced from the same analysis.

Signals a and c are consequently assigned to Cys138H $\beta$  geminal protons.

(b) *Assignments of Hydrophobic Non-Ligand Residues.* In rusticyanin three-dimensional structure, an isoleucine (Ile140) and up to five aromatic residues (phenylalanines 51, 54, 76, 83, and 111) present protons within 7.5 Å from the metal ion. We have identified their corresponding resonances in the present study. For the sake of clarity in the following discussion, Figure 4, panels A–D, describe the relative disposition of these residues as well as their observed dipole–dipole connectivities. The same numeration is followed as in Figure 3, panels A–H, as well as in the NOESY experiments in Supporting Information.

Two signals of triple intensity (signals s and u, Figure 2) upfield shifted indicate the presence of two methyls very close to the metal ion. From the available three-dimensional structures, they have to belong to the residue Ile140 (Figure 4, panel A). Signals x and z give NOEs between them and very strong NOESY with the two methyl signals (see Supporting Information) suggesting they both belong to the same spin system. The NOEs between His143H $\epsilon$ 2 and His143H $\delta$ 2 with IleCH $3\delta$  (NOEs 1, in Figure 3, panel D, and Figure 4, panel B, and 2, in Figure 3, panel G, and Figure 4, panel B) as well as the NOESY experiments (Supporting Information) also corroborate this assignment. TOCSY experiments (see Supporting Information) are in agreement with the present assignment, although cross-peaks implicating signals s, w, and z are lost due to their line broadening. The assignment of Ile140 protons is given in Table 1.

Signal k, of triple intensity, remains folded in all the pH and temperature ranges studied, indicating that these three protons correspond to a unique spin system. This signal has

Table 1: Chemical Shifts and Relaxation Times for the Most Relevant Assigned Protons

residue	proton	signal	$\delta_{\text{exp}}$ (ppm)	$T_1$ (ms)	$\Delta\nu_{1/2}$ (Hz)
Residues With Contact Contribution					
His85	HN		5.70		
	H $\beta$ 1	v	-15.78	4.3	380
	H $\delta$ 2	h	59.7	8.4	280
	H $\epsilon$ 2	g	69.2	3.5	430
Cys138	H $\beta$	a	287	<0.4	~3000
	H $\beta'$	c	260	<0.4	~3000
His143	HN		8.95		
	H $\delta$ 2	i	48.7	7.2	330
	H $\epsilon$ 2	f	80.3	1.5	620
Met148	HN		0.97		
	H $\alpha$		-1.58		
	H $\beta$ 1	y	-30.96	3.2	470
	H $\beta$ 2	w	-24.39	1.7	~400
	H $\gamma$ 1	d	122.9	1.0	1200
	H $\gamma$ 2	b	285.2	1.3	800
	CH $_3\epsilon$	e	103.3	1.2	1800
Ser86	HN	p	-2.57	14.0	200
	H $\alpha$				
Non-Ligand Hydrophobic Residues					
Phe51	H $\delta$		12.3		
	H $\epsilon,\zeta$	k	21.84	7.9	390
Phe54	H $\delta$		10.98		
	H $\epsilon$		13.17		
	H $\zeta$	j	22.10	6.5	
Phe76	H $\delta$		7.62		
	H $\epsilon$		7.16		
	H $\zeta$		7.40		
Phe83	H $\beta$ 1		9.07		
	H $\beta$ 2		12.1		
	H $\delta$	l	18.81	11.5	210
	H $\epsilon$		12.35		
Phe111	H $\delta$		6.71		
	H $\epsilon$		6.20		
Ile140	H $\alpha$		1.22		
	CH $_3\gamma$ 2	s	-7.25	8.7	300
	H $\gamma$ 11	x	-27.38	3.2	530
	H $\gamma$ 12	z	-34.35	1.7	670
	CH $_3\delta$	u	-11.24	13.0	130

to correspond to the H $\epsilon$  and H $\zeta$  aromatic protons of a phenylalanine ring. Signal f (His143H $\epsilon$ 2) gives NOE with signal k (NOE marked as 3 in Figure 3, panel D), expected between His143H $\epsilon$ 2 and Phe51H $\zeta$  and H $\epsilon$  protons (Figure 4, panel B). The strong cross-peak observed in the NOESY with 7 ms of mixing time (Supporting Information) between signal k and a signal at 12.3 ppm allows us to assign Phe51H $\delta$  protons. The NOE observed between signal i and the signal at 12.3 ppm (expected between His143H $\delta$ 2 and Phe51H $\delta$  protons, NOE 4 in Figure 3, panel G, and Figure 4, panel B) confirms the assignment.

His85 is close enough to Phe83 to give dipolar connectivities with its aromatic ring protons. Signal g (His85H $\epsilon$ 2) is giving NOE with signal l, of double intensity, and with a signal at 12.1 ppm (NOEs 5 and 6, Figure 3, panel E, and Figure 4, panel C). The analysis of the NOESY and TOCSY experiments (Supporting Information) indicates that these signals have to arise from Phe83H $\delta$  and H $\beta$ 2 protons. Several dipolar connectivities observed between the aromatic rings of Phe51 and Phe83 (NOEs 7 and 8, Figure 4, panel C) are observed in the corresponding NOESY, confirming the assignment.

In a similar way, Phe54, close to the ligand Met148, is assigned. In Figure 4, panel D, the dipole-dipole connectivities expected between these two amino acids are marked

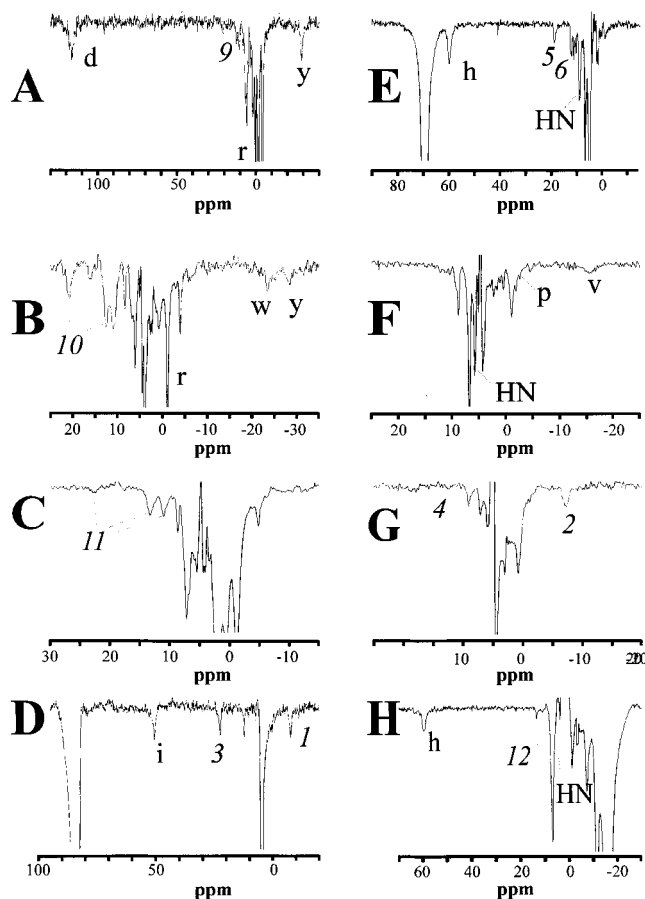


FIGURE 3: Steady-state 1D NOE difference spectra obtained after irradiating: (A) signal B, Met148H $\gamma$ 2; (B) signal D, Met148H $\gamma$ 1; (C) signal E, Met148CH $_3\epsilon$ ; (D) signal F, His143HN $\epsilon$ 2; (E) signal G, His85HN $\epsilon$ 2; (F) signal H, His85H $\delta$ 2; (G) signal I, His143 $\delta$ 2; (H) signal V, His85 $\beta$ 1. Lower case letters and numbers in italics indicate the signals whose NOEs are observed. The numeration of the NOEs is the same as in Figure 4. The x-axis scale is different depending on the chemical shifts of the observed NOEs.

with the numbers 9–11. The corresponding experimental NOEs are marked with the same numbers in Figure 3, panel A–C. The NOEs of Met148H $\gamma$ 1 and CH $_3\epsilon$  with Phe54H $\zeta$  allow us to identify signal j, a fast relaxing proton under signal k (the existence of this signal is clearly identified at 10 °C, data not shown). The line broadening of cross-peaks implicating Phe54 clearly indicates that the aromatic ring of this phenylalanine is in slow exchange on the NMR time scale at 20 °C. Phe76 is identified from the NOEs observed with His85 $\beta$ 1 (NOE 12 in Figure 3, panel H, and Figure 4, panel C). Finally, Phe111 assignment is obtained from the NOESY between Ile140CH $_3\delta$ 2 and a signal at 6.71 ppm (data not shown). For these two amino acids (Phe76 and Phe111), TOCSY experiments were successful in corroborating the assignment.

(c) Other Assignments. The exchangeable upfield-shifted signal p is assigned to Ser86HN due to the NOE connectivities observed with both His85 H $\delta$ 2 and H $\beta$ 1 protons (see Figure 3, panels F and H, respectively). Ala44, Val45, Pro52, Ser53, Asn80, Gly84, and Gly142 were assigned from the NOESY connectivities with the previously assigned residues in conjunction to the NOESY and TOCSY connectivities. In Supporting Information, cross-peaks and spin patterns implicating these residues are indicated with the same

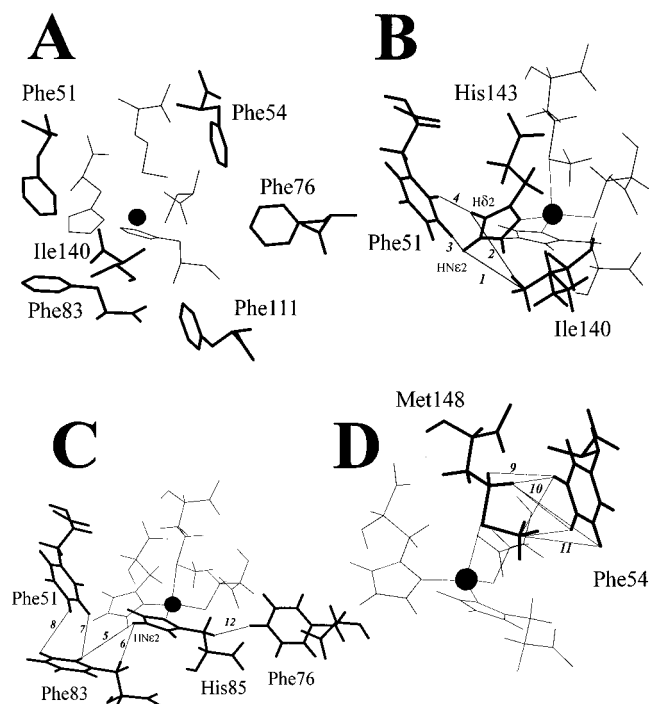


FIGURE 4: (A) Overview distribution of the apolar residues close to the metal ion (Ile140, and phenylalanines 51, 54, 76, 83, and 111, in black). The rest of the figures (in which the protons are included) represent the expected NOEs implicating some protons of these apolar residues and (B) His143, (C) His85, and (D) Met148. Rc coordinates have been taken from the a3zpdb.ent file. The numeration of the NOEs is the same as in Figure 4. In all the figures, the four ligands are displayed (with thick lines) for a better comprehension of the relative orientation of the residues.

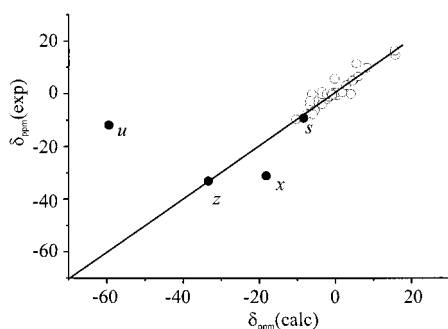


FIGURE 5: Plot of the experimental versus calculated dipolar shifts in CoRc. The points marked in dark correspond to Ile148 protons (signals *u*, *s*, *x*, *z*). They have not been included in the calculations (see text).

numbers as the position of the residue in the amino acid sequence of the protein.

**Determination of the Magnetic Susceptibility Tensor.** The assignment of 34 protons belonging to noncoordinated residues allows us to calculate the orientation of the main axes of the magnetic susceptibility tensor of CoRc as well as the magnitude of its magnetic susceptibility anisotropy components. In Figure 5, the calculated versus the experimental dipolar shifts for these 34 protons are shown. These values together with the assignment of each signal are reported in Supporting Information. If we eliminate Ile140 protons from the analysis, a good agreement between the calculated and the experimental  $\delta_{\text{dip}}$  data is observed, with a good value for the linear regression coefficient (0.93). These data clearly indicate the applicability of the metal-centered model (eq 2) to our system.

As it was just commented, some protons of Ile140 do not fit well with the values calculated by applying eq 2 and by using any of the available (crystal or solution) three-dimensional structures of Rc. In fact, while there is an acceptable fit for IleHN, H $\alpha$ , H $\gamma$ 12, and CH $\gamma$ 2 protons, Ile140 CH $\delta$  methyl and Ile140H $\gamma$ 11 proton are clearly in disagreement with the calculated data (see Figure 5). According to its expected value, the signal corresponding to Ile140CH $\delta$  (signal *u*) should appear much more upfield shifted (at  $-51$  ppm) than it appears ( $-11.2$  ppm). In contrast, Ile140H $\gamma$ 11 (signal *x*) should appear much more downfield shifted (at  $-17$  ppm) than it appears ( $-31$  ppm). The  $T_1$  values of these two protons are also different from those values expected from their distances to the metal ion. In fact, if we compare the longitudinal relaxation times of protons whose signals are resolved, the Ile140H $\gamma$ 11 proton should show a higher  $T_1$  value (higher than 5 ms, instead of the observed 3.2 ms value, Table 1). In contrast, Ile140CH $\delta$ , at 4.1 Å from the metal ion, should have a much shorter  $T_1$  value (lower than 5 ms, instead of the experimental value of 13.0 ms, Table 1). This takes us to the conclusion that Ile140 side chain is, at least in our working conditions, in a different relative position with regard to the metal ion as compared to that found in the previously obtained three-dimensional structures of Rc. In these structures, the dihedral angle C $\alpha$ -C $\beta$ -C $\gamma$ -C $\delta$  of Ile140 has a value of  $(177 \pm 8)^\circ$ . We have calculated the pseudocontact contribution for Ile CH $\delta$  methyl protons changing this dihedral angle between  $177^\circ$  and  $\pm 180^\circ$  in steps of  $10^\circ$  and leaving the rest of the structure unchanged. If we assumed a value of  $-130^\circ$  (i.e., a rotation of  $+53^\circ$ ) for this angle, the expected value of its dipolar shift would be  $-14.5$  ppm and the distance to the metal ion would be 5.3 Å. These two values would be in good agreement with our experimental results. On the other hand, if we carefully examine the orientation of the Ile140 side chain in the available family of the solution structures (1cur.ent pdbfile) we realize that two of them (structures 17 and 23) have the same orientation and proton-metal ion distances as we expect from our present study. This means that the present data are consistent with the experimental restraints used in the solution structure determination (22). Therefore, it is probable that a conformational change implicating this dihedral angle takes place in solution. Since paramagnetic NMR is much more sensible to local conformation changes for residues close to the metal ion than diamagnetic NMR, we then conclude that this is the main (if not the only one) Ile140 side chain orientation in our working conditions. This conformational change of Ile140 could be relevant in the hydrophobicity environment of the metal ion (see below).

In Table 2, the angles that the main axes of the magnetic susceptibility tensor form with the bonds between the metal ion and the coordinated atoms are given. The calculated magnetic susceptibility anisotropy components are also given. In Figure 6, the orientation of these axes with respect to the four bonds of the cobalt ion is displayed. In both cases, the analogous data for cobalt(II) azurin are also reproduced (from ref 37). The first evident result is the large degree of concordance between the orientation of the magnetic axes in both cobalt(II) metallo-derivatives (see Table 2). We can clearly conclude that the orientation of the magnetic susceptibility tensor in CoRc is analogous in CoAz, and thus,

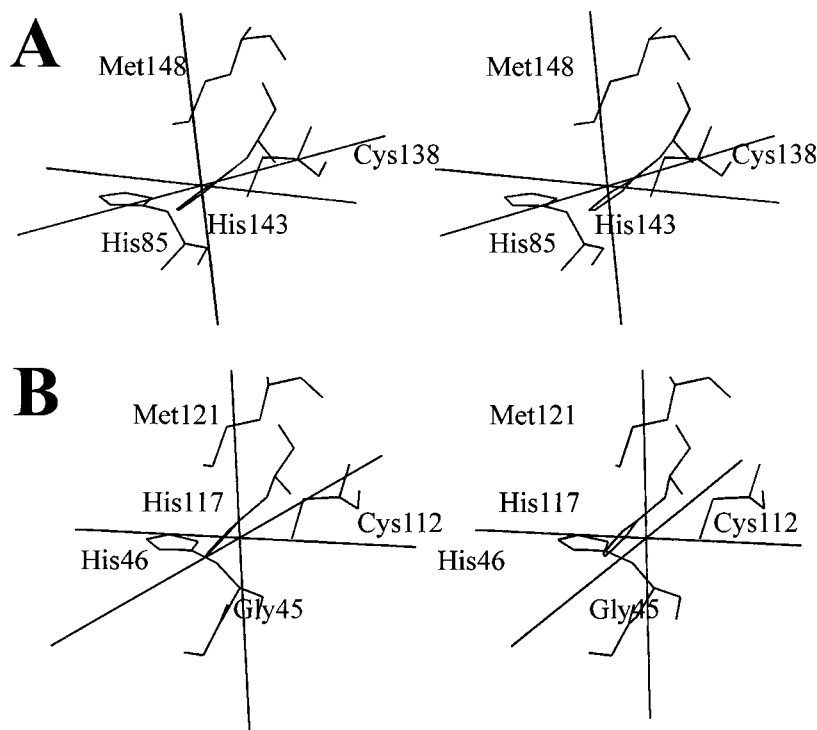


FIGURE 6: Stereoview representation of the principal axes of the magnetic susceptibility tensor with respect to the metal–ligand bonds for (A) CoRc and (B) CoAz (from ref 37).

Table 2: Angles (in Degrees) of the Main Axes of the Magnetic Susceptibility Tensor with Respect to the Bonds between the Metal Ion and the Coordinated Atoms for Cobalt(II) Rusticyanin<sup>a</sup> and for Cobalt(II) Azurin<sup>b</sup>

	CoRc			
	Met148S $\delta$	Cys138S $\gamma$	His85N $\delta$ 1	His143N $\delta$ 1
$\chi_{xx}$	73 $\pm$ 4	100 $\pm$ 4	37 $\pm$ 4	139 $\pm$ 4
$\chi_{yy}$	99 $\pm$ 4	155 $\pm$ 4	55 $\pm$ 4	49 $\pm$ 4
$\chi_{zz}$	160 $\pm$ 5	68 $\pm$ 5	80 $\pm$ 5	94 $\pm$ 5
$\Delta\chi_{ax}$ ( $m^3 \times 10^{32}$ )	-5.3 $\pm$ 0.3			
$\Delta\chi_{rh}$ ( $m^3 \times 10^{32}$ )	-5.1 $\pm$ 0.3			
	CoAz			
	Met121S $\delta$	Cys112S $\gamma$	His46N $\delta$ 1	His117N $\delta$ 1
$\chi_{xx}$	92 $\pm$ 4	96 $\pm$ 4	37 $\pm$ 4	139 $\pm$ 4
$\chi_{yy}$	83 $\pm$ 5	174 $\pm$ 5	54 $\pm$ 5	51 $\pm$ 5
$\chi_{zz}$	159 $\pm$ 4	91 $\pm$ 4	95 $\pm$ 4	81 $\pm$ 4
$\Delta\chi_{ax}$ ( $m^3 \times 10^{32}$ )	-6.8 $\pm$ 0.3			
$\Delta\chi_{rh}$ ( $m^3 \times 10^{32}$ )	2.8 $\pm$ 0.1			

<sup>a</sup> Calculated magnetic susceptibility anisotropy components are given as well. <sup>b</sup> Values for CoAz are obtained from ref 37.

the orientation of the molecular orbitals in both cobalt metallo-substituted BCPs also is essentially the same. As it was indicated in the introduction section (Figure 1), the interaction Co–S $\delta$ Met is much stronger in CoRc than in CoAz. Our present results indicate that this different strength of the axial interaction does not alter the overall electronic structure of the metal ion.

The values of  $\Delta\chi_{ax}$  and  $\Delta\chi_{rh}$  are both quite large, expected when zero-field splitting (ZFS) effects are present. In highly symmetrical tetrahedral Co(II) complexes, the ground state is a term A<sub>2</sub>, orbitally nondegenerate. In these cases, the expected magnetic anisotropy is very low, and, consequently, a very low dispersion would be observed in the pseudo-diamagnetic region of the <sup>1</sup>H NMR spectrum. This is not

our case. Hence, even if cobalt(II) is four-coordinated in Rc (as is clearly the case), low symmetry components are present, giving a large degree of magnetic anisotropy. This suggests a C<sub>s</sub> symmetry for the cobalt(II) more than a tetrahedral one as occurs in the native oxidized protein, and it corroborates the fact that cobalt(II) in Rc has a very similar coordination sphere to copper(II) in Rc.

*Residues with Contact Contribution.* The pseudocontact and contact contributions of protons belonging to the coordinated residues are displayed in Table 3. Again we have also included the corresponding data for CoAz from ref 37. Data for Ser86 (Asn47 in azurin) protons, having contact contribution, are also reported.

In contrast with the chemical shift values of Gly46 in azurin, the contact contribution of Gly84 is negligible, indicating that the carbonyl group of this amino acid is not coordinated in cobalt rusticyanin. This confirms that cobalt(II) in Rc has the same coordination as the copper(II) ion in the native Rc (see Figure 1). This coordination (in both native or cobalt derivatives) is different to that present in azurin. On the other hand, the chemical shifts implicating the axial methionine protons (Met148 in Rc, Met120 in Az) display large and very evident differences in both derivatives. Met148CH<sub>3</sub> $\epsilon$  methyl protons show a contact contribution of 106 ppm larger in CoRc than in CoAz. Moreover, the contact contributions of MetH $\gamma$ 1 and H $\gamma$ 2 protons are higher in CoRc than in CoAz by values of 68 and 300 ppm, respectively. This conclusive data reflects the much stronger bond of the metal ion to the axial methionine in Rc than in Az. In fact, in the native Rc the Cu–S $\delta$ Met distance is 2.75 Å, while in azurin this distance is 3.2 Å. The contact contribution of these axial methionine protons depends on the unpaired spin density on the resonating nuclei (that, in turn, reflects the strength of the covalent bond) and on the dihedral angle of the implicated covalent bonds (52, 53). For the Met148CH<sub>3</sub> $\epsilon$

Table 3: Calculated Dipolar and Contact Contributions for the Hyperfine Shifts of the Protons of the Coordinated Residues for the Cobalt(II) Derivatives of Rusticyanin and Azurin<sup>a</sup>

residue	proton	CoRc		CoAz	
		$\delta_{\text{dip}}$ (ppm)	$\delta_{\text{con}}$ (ppm)	$\delta_{\text{dip}}$ (ppm)	$\delta_{\text{con}}$ (ppm)
Gly84(85) <sup>b</sup>	HN			-9.80	10.7
	H $\alpha$ 1			-10.53	54.2
	H $\alpha$ 2			-26.71	-5.9
His85(46)	HN	-11.8	11.47	-11.22	-6.1
	H $\beta$ 1	-8.5	-11.22	7.08	5.6
	H $\delta$ 2	-1.9	53.6	7.75	37.3
	H $\epsilon$ 2	10.3	44.2	16.56	46.9
Cys138(112)	H $\beta$	69.9	205	5.38	223.2
	H $\beta'$	59.7	184	-5.27	287.4
His143(117)	HN	-3.79	1.1	2.56	3.2
	H $\delta$ 2	3.4	38.5	7.18	42.3
	H $\epsilon$ 2	19.9	48.9	7.47	46.8
Met148(121)	HN	-6.3	-1.6	-5.52	-1.8
	H $\alpha$	-7.37	1.75	-9.93	2.5
	H $\beta$ 1	-23.2	-9.8	-25.93	5.3
	H $\beta$ 2	-13.5	-17.4	-26.85	6.1
	H $\gamma$ 1	-11.5	132.5	-19.53	64.4
	H $\gamma$ 2	-19.2	301.6	-20.22	-0.3
	CH <sub>3</sub> $\epsilon$	-16.9	130.3	-31.21	24.0
Ser86(Asn47)	HN	15.9	-26.5	30.1	-33.6
	H $\alpha$	4.7	3.2	5.36	5.3

<sup>a</sup> Ser86 backbone protons, which have contact contribution, are included in the table. <sup>b</sup> Numbers between parentheses indicate the residue in azurin.

methyl protons, there is no dependence on the dihedral angle. Thus, we can estimate an average value for the covalent contribution of 65 ppm for CoRc while in CoAz the analogous contribution only represents 12 ppm. This means that there is roughly 5 times more covalence in the Co-S $\delta$ (axial methionine) bond in CoRc than in CoAz.

Met148H $\gamma$  protons experience the unpaired spin density in the same magnitude as MetCH<sub>3</sub> $\epsilon$  methyl protons, although, in this case, a dihedral angle dependence shown has to be operative. Taking the average  $\delta_{\text{av}} = (\delta_{\text{conH}\gamma 1} + \delta_{\text{conH}\gamma 2})/2$  (34) for the contact contributions of the two methylene H $\gamma$  protons, a value of 216 ppm for the covalent contribution to the hyperfine shift is obtained (Table 3). Again, we have to compare this value with that obtained for CoAz Met121H $\gamma$  protons (32 ppm, Table 3). Thus, the degree of covalence of the Co-S $\delta$ (axial methionine) bond is around 6 times higher for CoRc than for CoAz, consistent with the data obtained for the methyl protons (see above).

Two other points can be emphasized from Table 3. First, contact contribution for Cys138H $\beta$  protons is lower in CoRc than it is in CoAz. This is consistent with a lower interaction in the first derivative. The average  $\delta_{\text{av}} = (\delta_{\text{conH}\beta} + \delta_{\text{conH}\beta'})/2$  for the contact contributions of the two CysH $\beta$  protons in both CoRc and in CoAz (195 and 255 ppm, respectively) gives a 20% higher degree of covalence for CoAz than for CoRc. Second, Ser86 HN (Asn47 in CoAz), forming hydrogen bond with Cys138S $\delta$  atom, has roughly the same (negative) contact contribution in both metallo-derivatives. Hence, even when the charge of these two amino acids is different, the contribution to the electronic structure of the metal seems to be similar. Finally, imidazol rings of the two coordinated histidines in both proteins (CoRc and CoAz) seem to have similar unpaired spin density.

*Comparison with Other Cobalt Substituted BCPs.* Recently, the <sup>1</sup>H NMR spectra of Co(II) amicyanin. CoAm (51),

and Co(II) pseudoazurin, CoPs (A. Vila, personal communication) have been reported and assigned. In the case of CoPs, the axial methionine protons have very similar chemical shifts to those ones shown by CoRc in the present paper (the difference in the chemical shifts for the analogous protons of coordinated residues are lower than a 10% of their chemical shifts values). This is due to a similar orientation as well as to a similar strength of the metal-methionine interaction (19, 54). On the contrary, CoAm (as CoAz), with a clear different disposition of the axial methionine in the structure, shows completely different chemical shifts for the axial methionine protons as compared to the CoRc or the CoPs methionine chemical shifts. This indicates that the way in which the metal and methionine interact is decisive in the unpaired spin density residing on the methionine. However, the orientation of the magnetic susceptibility tensor (see above) and, hence, the electronic structure of the cobalt(II) ion, is essentially the same in both CoRc and CoAz, even when the interaction between the metal ion and the methionine is completely different in the proteins. Moreover, in all CoBCPs substituted proteins whose NMR spectra have been recorded (37 and refs therein), the distribution of the assigned protons clearly indicates a similar orientation of the magnetic susceptibility tensor. This strongly suggests a similar electronic structure for all of them, independently of the axial methionine interaction and its orientation.

*Implications in the High Redox Potential of Rusticyanin.* The degree of covalence between the metal ion and the axial methionine is thought to be one of the main determinants for modulating the interaction between the metal ion and the CysS $\gamma$  atom (4, 6, 23, 55). In fact, as previously commented, the substitution of the axial methionine in Rc by other amino acids of different polarity modifies the redox potential of the protein (23). However, the total span of the redox potentials in these mutants at a fixed pH value (pH 6.2) is 250 mV (from 363 mV for the RcE148 mutant to 613 mV for the RcL148 mutant, 23), while the span of the redox potentials in BCPs is 500 mV (from 185 mV for stellacyanin to 680 mV for Rc). Our present data clearly demonstrate that the methionine axial interaction is clearly different in CoRc to CoAz. However, in both cases this different interaction seems not to alter the electronic distribution and orientation of the orbitals with unpaired spin density of the cobalt ion. On the other hand, rusticyanin and pseudoazurin (whose cobalt derivatives have almost superimposable <sup>1</sup>H NMR spectra) redox potentials differ by a value as large as 400 mV. Then, it is clearly concluded that the different degree of the strength in the metal ion-axial methionine interaction is not the primary cause of the high redox potential found in rusticyanin.

On the contrary as observed in Figure 5, panel A, several hydrophobic residues are in the immediate vicinity of the metal ion. Particularly, Ile140 is an apolar residue sited very close to the metal ion that prevents the access of the water to the metal ion. This residue is not present in other BCPs, and its interaction with the metal ion has been proposed to be a crucial factor responsible for the high redox potential of this protein (19, 22, 23). From our present data, it is clearly observed that the effect of unpaired electrons on these residues is evident since all of them experience large dipolar contributions in their chemical shifts. Analogously, these hydrophobic residues have strong dipole-dipole interactions

with the unpaired spin electron(s). As it has been previously reported (not only for rusticyanin in the case of BCPs but also for other systems containing metal ions, such as ferredoxins and high potential iron proteins, 56), the hydrophobicity of the metal ion and its accessibility to the solvent are the determinant factors in the redox potential of metalloproteins. The dipole–dipole interactions between the resonating nuclei and the metal ions (observed in the present study by paramagnetic NMR) heavily influences the relative stability of different oxidation states of the copper, with the higher resident charge on the cupric ion, causing greater destabilization. Our present work clearly corroborates previous studies (19, 22, 23) in the sense that this dipolar effect is the most significant factor in determining the high redox potential of this protein.

## CONCLUSIONS

We have characterized the electronic structure of the metal ion in the cobalt(II)-substituted rusticyanin by  $^1\text{H}$  NMR. We have determined the magnetic susceptibility anisotropy components and the orientation of its main axes. These have allowed us to obtain the degree of the contact contribution to the chemical shifts of the protons belonging to the ligand residues, specially those of the axial ligand Met148. This, in turn, has allowed us to estimate the degree of covalence for the Co–S $\delta$ (Met148) interaction. This interaction is found to be stronger in CoRc than in CoAz in agreement with the crystallographic structures. However, the electronic structure of the metal ion is roughly the same in both metal-substituted BCPs. The presence of the hydrophobic residues has been suggested as a possible reason for the very high redox potential. The effect of unpaired electrons on these hydrophobic residues is evident in the form of large dipolar contributions in their chemical shifts. We suggest that this dipolar effect is a significant factor in determining the high redox potential of this protein.

## ACKNOWLEDGMENT

We thank Drs. Alejandro J. Vila (University of Rosario, Argentina) and Claudio Fernández (University of Buenos Aires, Argentina) for proportioning us their results on cobalt(II) pseudoazurin, as well as for many helpful discussions.

## SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Three figures displaying two weft-NOESY experiments (with 7 and 15 ms of mixing times, respectively) and a TOCSY experiment (with 35 ms of mixing time) are given. A table with the experimental and expected (according to eq 2) chemical shifts of the assigned protons are also included. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## REFERENCES

- Adman, E. T. (1991) *Adv. Prot. Chem.* 42, 145–197.
- Sykes, A. G. (1991) in *Advances in Inorganic Chemistry* (Sykes, A. G., Ed.) pp 377–408, Academic Press, New York.
- Messerschmidt, A. (1998) *Struct. Bonding* 90, 37–68.
- Randall, D. W., Gamelin, D. R., LaCroix, L. B., and Solomon, E. I. (2000) *J. Biol. Inorg. Chem.* 5, 16–29.
- Gray, H. B., and Winkler, J. R. (1996) *Annu. Rev. Biochem.* 65, 537–561.

- Solomon, E. I., Baldwin, M. J., and Lowery, M. D. (1992) *Chem. Rev.* 92, 521–542.
- Nar, H., Messerschmidt, A., Huber, R., van de Kamp, M., and Canters, G. W. (1991) *J. Mol. Biol.* 221, 765–772.
- Vila, A. J., and Fernandez, C. O. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* 118, 7291–7298.
- Hart, P. J., Nersissian, A. M., Herrmann, R. G., Nalbandyan, R. M., Valentine, J. S., Eisenberg, D., (1996) *Protein Sci.* 5, 2175–2183.
- Ducros, V., Brzozowski, A. M., Wilson, K. S., Brown, S. H., Ostergaard, P., Schnieder, P., Yaver, D. S., Pederson, A. H., and Davies, G. J. (1998) *Nat. Struct. Biol.* 5, 310–316.
- Baker, E. N. (1988) *J. Mol. Biol.* 203, 1071–1095.
- Malmström, B. G. (1965) in *Oxidases and Related Redox Systems* (King, T. E., Mason, H. S., and Morrison, M., Eds.) pp 207–216, Wiley, New York.
- Malmström, B. G. (1994) *Eur. J. Biochem.* 233, 711–718.
- Ingledeu, W. J., and Cocco, D. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 590, 141–158.
- Lappin, A. G., Lewis, C. A., and Ingledeu, W. J. (1985) *Inorg. Chem.* 24, 1446–1450.
- Blake, R. C., White, K. J., and Shute, E. A. (1991) *Biochemistry* 30, 9443–9449.
- Ingledeu, W. J., Cox, J. C., and Halling, P. J. (1977) *FEMS Microbiol. Lett.* 2, 193–197.
- Ronk, M., Shively, J. E., Shute, E. A., and Blake, R. C. (1991) *Biochemistry* 30, 9435–9442.
- Walter, R. L., Ealick, S. E., Friedman, A. M., Blake, R. C., Proctor, P., and Shoham, M. (1996) *J. Mol. Biol.* 263, 730–751.
- Shoham, M. (1992) *J. Mol. Biol.* 227, 581–582.
- Harvey, I., Hao, Q., Ingledeu, W. J., and Hasnain, S. S. (1998) *Acta Crystallogr. D* 54, 629–635.
- Botuyan, M. A., Toy-Palmer, A., Chung, J., Blake, R. C., Beroza, P., Case, D. A., and Dyson, H. J. (1996) *J. Mol. Biol.* 263, 752–767.
- Hall, J. F., Kanbi, L. D., Strange, R. W., and Hasnain, S. S. (1999) *Biochemistry* 38, 12675–12680.
- Moratal, J. M., Salgado, J., Donaire, A., Jimenez, H. R., and Castells, J. (1993) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 110–112.
- Salgado, J., Jimenez, H. R., Donaire, A., and Moratal, J. M. (1995) *Eur. J. Biochem.* 231, 358–369.
- Vila, A. J. (1994) *FEBS Lett.* 355, 15–18.
- Bertini, I., Ciurli, S., Dikij, A., Luchinat, C., Martini, G., and Safarov, N. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* 121, 2037–2046.
- Bertini, I., Fernandez, C. O., Karlson, B. G., Leckner, J., Luchinat, C., Malmström, B. G., Nersissian, A. M., Pierattelli, R., Shipp, E., Valentine, J. S., and Vila, A. J. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* 122, 3701–3707.
- Salgado, J., Kalverda, A. P., Dennison, C., and Canters, G. W. (1996) *Biochemistry* 35, 3085–3092.
- Donaire, A., Salgado, J., Jimenez, H. R., and Moratal, J. M. (1995) in *Nuclear Magnetic Resonance of Paramagnetic Macromolecules* (La Mar, G. N., Ed.) pp 213–244, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Fernandez, C. O., Sannazzaro, A. I., and Vila, A. J. (1997) *Biochemistry* 36, 10566–10570.
- Fernandez, C. O., Sannazzaro, A. I., Diaz, L. E., and Vila, A. J. (1998) *Inorg. Chim. Acta* 273, 367–372.
- Salgado, J., Jimenez, H. R., Moratal, J. M., Kroes, S. J., Warmerdam, G. C. M., and Canters, G. W. (1996) *Biochemistry* 35, 1810–1819.
- Vila, A. J., Ramirez, B. E., Di Bilio, A. J., Mizoguchi, T. J., Richards, J. H., and Gray, H. B. (1997) *Inorg. Chem.* 36, 4567–4570.
- Bertini, I., and Luchinat, C. (1996) in *NMR of Paramagnetic Substances*, Coord. Chem. Rev. 150, Elsevier, Amsterdam.
- Bertini, I. and Luchinat, C. (1986) in *NMR of Paramagnetic Molecules in Biological Systems*, Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA.
- Donaire, A., Salgado, J., and Moratal, J. M. (1998) *Biochemistry* 37, 8659–8673.
- Hall, J. F., Hasnain, S. S., and Ingledeu, W. J. (1996) *FEMS Microbiol. Lett.* 137, 85–89.



39. Hall, J. F., Kanbi, L. D., Harvey, I., Murphy, L. M. M., and Hasnain, S. S. (1998) *Biochemistry* 37, 11451–11458.
40. Inubushi, T., and Becker, E. D. (1983) *J. Magn. Reson.* 51, 128–133.
41. Vold, R. L., Waugh, J. S., Klein, M. P., and Phelps, D. E. (1968) *J. Chem. Phys.* 48, 3831–3832.
42. Emerson, S. D., Lecomte, J. T. J., and La Mar, G. N. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110, 4176–4182.
43. Banci, L., Bertini, I., Luchinat, C., Piccioli, M., Scozzafava, A., and Turano, P. (1989) *Inorg. Chem.* 28, 4650–4656.
44. Chen, Z. G., de Ropp, J. S., Hernandez, G., and La Mar, G. N. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* 116, 8772–8783.
45. Banci, L., Bertini, I., Luchinat, C., Messori, L., and Turano, P. (1993) *Appl. Magn. Reson.* 4, 461–476.
46. Banci, L., Bertini, I., and Luchinat, C. (1994) in *Methods Enzymol.* (James, T. L. and Oppenheimer, N. J., Eds.) Vol. 239, pp 485–514, Academic Press, Inc., London.
47. Banci, L., Bertini, I., Bren, K. L., Cremonini, M. A., Gray, H. B., Luchinat, C., and Turano, P. (1996) *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.* 1, 117–126.
48. Hunt, A. H., Toy-Palmer, A., Cavanagh, J., Blake, R. C., II, and Dyson, H. J. (1994) *J. Mol. Biol.* 244, 370–384.
49. Moratal, J. M., Salgado, J., Donaire, A., Jimenez, H. R., and Castells, J. (1993) *Inorg. Chem.* 32, 3587–3588.
50. Piccioli, M., Luchinat, C., Mizoguchi, T. J., Ramirez, B. E., Gray, H. B., and Richards, J. H. (1995) *Inorg. Chem.* 34, 737–742.
51. Salgado, J., Kalverda, A. P., Diederix, R. E. M., Canters, G. W., Moratal, J. M., Lawler, A. T., and Dennison, C. (1999) *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.* 4, 457–467.
52. Karplus, M. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2870–2871.
53. Bertini, I., Capozzi, F., Luchinat, C., Piccioli, M., and Vila, A. J. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* 116, 651–660.
54. Cunane, L. M., Chen, Z. W., Durley, R. C. E., and Mathews, F. S. (1996) *Acta Crystallogr. D* 52, 676–686.
55. Wittung-Stafshede, P., Hill, M. G., Gomez, E., Di Bilio, E., Karlsson, B. G., Leckner, J., Winkler, J., Gray, H. B., and Malmstrom, B. G. (1998) *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.* 3, 367–370.
56. Beinert, H. (2000) *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.* 5, 2–15 (and references therein).

BI001971U



## Paramagnetism-based versus classical constraints: An analysis of the solution structure of Ca Ln calbindin D<sub>9k</sub>

Ivano Bertini<sup>a,\*</sup>, Antonio Donaire<sup>b</sup>, Beatriz Jiménez<sup>b</sup>, Claudio Luchinat<sup>c</sup>, Giacomo Parigi<sup>c</sup>, Mario Piccioli<sup>a</sup> & Luisa Poggi<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Magnetic Resonance Center (CERM) and Department of Chemistry, University of Florence Via L. Sacconi, 6, I-50019 Sesto Fiorentino, Italy; <sup>b</sup>Department of Chemistry, Universidad Cardenal Herrera-CEU, Avda. Seminario s/n, 46113-Montcada, Valencia, Spain; <sup>c</sup>Magnetic Resonance Center (CERM) and Department of Agricultural Biotechnology, University of Florence, Via L. Sacconi, 6, I-50019 Sesto Fiorentino, Italy

Received 17 April 2001; Accepted 16 July 2001

**Key words:** calcium binding proteins, paramagnetic NMR, paramagnetism based constraints, solution structure, sparse NOEs, structure refinement

### Abstract

The relative importance of paramagnetism-based constraints (i.e. pseudocontact shifts, residual dipolar couplings and nuclear relaxation enhancements) with respect to classical constraints in solution structure determinations of paramagnetic metalloproteins has been addressed. The protein selected for the study is a calcium binding protein, calbindin D<sub>9k</sub>, in which one of the two calcium ions is substituted with cerium(III). From 1823 NOEs, 191 dihedral angles, 15 hydrogen bonds, 769 pseudocontact shifts, 64 orientational constraints, 26 longitudinal relaxation rates, plus 969 pseudocontact shifts from other lanthanides, a final family with backbone r.m.s.d. from the average of 0.25 Å was obtained. Then, several families of structures were generated either by removing subsets of paramagnetism-based constraints or by removing increasing numbers of NOEs. The results show the relative importance of the various paramagnetism-based constraints and their good complementarity with the diamagnetic ones. Although a resolved structure cannot be obtained with paramagnetism-based constraints only, it is shown that a reasonably well resolved backbone fold can be safely obtained by retaining as few as 29 randomly chosen long-range NOEs using the standard version of the program PSEUDYANA.

### Introduction

In the early 1980s the basis were laid down for the solution structure determination of proteins (Wüthrich, 1996). In the beginning the structural constraints were essentially NOEs and <sup>3</sup>J coupling values and the software was essentially based on optimisation of the dihedral angles of polypeptides in order to match the NOE based distances and the ranges of dihedral angles determined by the <sup>3</sup>J values (Güntert et al., 1991; Güntert and Wüthrich, 1991). The NOEs do not provide precise distances as they are affected by mobility and spin diffusion. Even the angle constraints were

used with large tolerance. As a consequence, a good structure was, and still is, the result of as many as possible constraints.

During the years new constraints have been used into structure calculations: angles obtained from cross-correlation effects (Reif et al., 1997), residual dipolar couplings (rdc) when the protein is partially oriented in high magnetic fields (Tolman et al., 1995; Tjandra et al., 1996, 1997; Vold and Prosser, 1996; Bax and Tjandra, 1997) and hydrogen bonds (Cordier and Grzesiek, 1999), together with constraints derived from the Chemical Shift Index (CSI) (Wishart et al., 1991; Gagne' et al., 1994). The strong interest for new constraints arises from the need of solving structures without NOEs or with relatively few of them. Indeed,

\*To whom correspondence should be addressed. E-mail: bertini@cerm.unifi.it

the assignment of protein signals is less limited by the protein size than the obtainment of NOE cross-peaks (Yamazaki et al., 1997) (Salzmann et al., 1999; Hus et al., 2000). In proteins containing paramagnetic metal ions paramagnetism-based constraints can be exploited (Bertini et al., 2001c). They are the contact shifts, the pseudocontact shifts, the hyperfine shifts as sum of the two, and the relaxation enhancements. The contact shifts, whenever available, contain structural information in principle, although only in a few cases a relationship was proposed (Bertini et al., 1994). The use of hyperfine shifts as such was suggested in the case of low spin heme proteins (Bertini et al., 1999). The pseudocontact shifts (pcs) (Banci et al., 1996, 1998a; Kechuan and Gochin, 1999), which are operative in the presence of magnetic anisotropy, are given by the following equation (Kurland and McGarvey, 1970):

$$\delta_i^{pcs} = \frac{1}{12\pi r_i^3} [\Delta\chi_{ax}(3\cos^2\theta_i - 1) + \frac{3}{2}\Delta\chi_{rh}\sin^2\theta_i\cos 2\phi_i], \quad (1)$$

where  $\Delta\chi_{ax}$  and  $\Delta\chi_{rh}$  are the axial and rhombic anisotropy parameters of the magnetic susceptibility tensor of the metal,  $r_i$  is the distance between the atom  $i$  and the metal ion, and  $\theta_i$  and  $\phi_i$  are the spherical polar angles of atom  $i$  with respect to the principal axes of the magnetic susceptibility tensor centred on the metal ion.

The occurrence of magnetic anisotropy causes partial orientation in high magnetic field, which generates rdc (Tolman et al., 1995; Tjandra et al., 1996; Vold and Prosser, 1996; Bax and Tjandra, 1997). The equation describing this effect is similar to that of pcs. However, the metal nucleus distance is not present as a parameter, and the magnetic anisotropy is that of the whole protein instead of that of the metal ion (Banci et al., 1998a). In the system studied here the two anisotropies are very close.

$R_{1p}$  and  $R_{2p}$  (where  $p$  stays for paramagnetic) are proportional to  $r^{-6}$ , where  $r$  is the distance between the unpaired electron and the resonating nucleus. As such, they are constraints similar to NOEs (Bertini et al., 1996).  $R_{1p}$  involves many more nuclei than  $R_{2p}$ , as diamagnetic  $R_2 > R_1$ . For  $R_{1p}$ , cross-relaxation tends to equalize the values (Granot, 1982; La Mar and de Ropp, 1993), and for both  $R_{1p}$  and  $R_{2p}$  the assumption that the electron is localized on the metal ion(s) may be a problem (Wilkins et al., 1998). These issues have been analysed and assessed in previous works, so that now safe procedures are available (Bertini et al.,

1996). Finally, NMR approaches have been developed to identify metal ion ligands (Bertini et al., 2001a). The latter can be used as structural constraints.

The solution structure of an artificial paramagnetic molecule was solved with a wealth of constraints both classical/diamagnetic and paramagnetism-based. The protein is the mono  $Ce^{3+}$  substituted Calbindin  $D_{9k}$ , which has 76 amino acids and bears two  $Ca^{2+}$  ions in its native state (Linse et al., 1987). The structure is well resolved, especially in the backbone part, on which the efforts were concentrated. Such a well resolved structure of a paramagnetic molecule is already a meaningful result, which we would like to pose to the attention of the scientific community. In fact, paramagnetism decreases the number and quantitative meaning of classical NOEs, especially around the metal ion, which is then compensated by the new constraints. The use of paramagnetism-based constraints on this system had already been explored by us (Allegrozzi et al., 2000). In this research, a number of diamagnetic constraints was determined by extending the whole assignment on a  $^{13}C$ ,  $^{15}N$ -labeled sample (i) in order to obtain a very well defined structure as a starting point, and (ii) to make sure that the diamagnetic constraints were by themselves sufficient for a high resolution structure. Then, one class at a time of paramagnetism-based constraints has been neglected, to assess its contribution in the definition of the structure. Therefore, this study shows the relevance of each paramagnetism-based constraint. The ultimate goal is to contribute to the discussion on the possibility of solving solution structure of proteins without, or with a limited number, of NOEs. This is essential in the framework of high throughput structure determination aiming at the obtainment of quick, reliable information on protein scaffold.

## Material and methods

### Sample preparation

Protein expression (Brodin et al., 1986) and purification (Johansson et al., 1990) of both the  $Ca^{2+}$  and the apo form of the bovine Pro43→Met43 (P43M) mutant (Chazin et al., 1989; Malmendal et al., 1998) of calbindin  $D_{9k}$  was performed as reported. The expression system was a generous gift of Prof. S. Forsén. The labelling and lanthanide substitution procedure is described elsewhere (Allegrozzi et al., 2000; Bertini et al., 2001a). The pH was adjusted to 6.0 by

means of 0.1 M NaOH or 0.1 M HCl. The samples were kept at 4 °C in between measurements. Sample concentrations range from 1.5 to 2.0 mM.

### *NMR spectroscopy*

Experiments were performed at 300 K and on Bruker Avance spectrometers operating at 600, 700 or 800 MHz. Three-dimensional HNCA and HNCOC experiments (Kay et al., 1990) were performed to assign backbone resonances. For the above experiments spectral windows of 12.8 ppm for  $^1\text{H}$ , 28 ppm for  $^{15}\text{N}$ , and 14 ppm (HNCOC) or 27 ppm (HNCA) for  $^{13}\text{C}$  dimensions were typically used. The number of real data points acquired were 128 or 256 in the  $t_1$  dimension ( $^{13}\text{C}$ ), from 40 to 64 in the  $t_2$  dimension ( $^{15}\text{N}$ ), and 1024 or 2048 in acquisition ( $t_3$  dimension). Three dimensional HNHA (Vuister and Bax, 1993), NOESY-HSQC (Kay et al., 1989), and HNHB (Archer et al., 1991) experiments were carried out to determine  $\phi$ ,  $\psi$  and  $\chi$  dihedral angles restraints. Spectral widths of 12 ppm for both  $^1\text{H}$  dimensions and 30 ppm for  $^{15}\text{N}$  dimension were used. The number of real data points acquired were from 64 to 96 points in the  $^{15}\text{N}$  dimension, from 128 to 256 in the indirect  $^1\text{H}$  dimension, and 1024 or 2048 in acquisition ( $t_3$  dimension). The 3D NOESY-HSQC experiment was repeated at 278 K to observe the exchangeable amide protons of Gly42 and Met43. For all the above experiments, from 8 to 16 scans were collected, using a relaxation delay of 800 ms. The total time for each scan was, in all cases, *ca.* 2 seconds. Decoupling of  $^{15}\text{N}$  nuclei during acquisition was performed using a GARP pulse sequence (Shaka et al., 1985).

A 2D HNCOC experiment with a  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$  inept transfer delay of 66.6 ms was also acquired. This delay optimizes the coherence transfer between an amide proton and the carbonyl of a group that is making hydrogen bond with it to provide spectroscopic evidence for H-bond patterns (Cordier and Grzesiek, 1999).

Two dimensional non-selective inversion-recovery  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  HSQC experiments were performed to measure non-selective longitudinal relaxation rates of protons (Bertini et al., 1996). In order to measure  $T_1$  values of very fast relaxing protons, all (inept transfer, acquisition and relaxation) delays were shortened. The inept transfer delays were 1.4 and 0.8 ms for  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$ , respectively, relaxation delays were typically 500 ms. In order to measure  $T_1$  values of moderately fast relaxing protons,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  non-selective

IR-HSQC were collected with usual delays for inept transfer and relaxation ( $1/4^1J$  and 1 s, respectively).

All the data were zero-filled in the indirect dimensions and apodized using cosine squared functions. All NMR data were processed with the Bruker XWIN-NMR software packages. The program XEASY (ETH Zürich) (Eccles et al., 1991) was used for the analysis of the NMR spectra.

### *NMR restraints*

#### *NOESY restraints*

The dipole-dipole restraints used in the present work are those obtained from NOESY and 1D NOE experiments for calbindin  $\text{D}_{9\text{K}}$  in which the native calcium in site II is replaced by cerium (CaCeCb hereafter), as previously reported (Allegrozzi et al., 2000). However, the 1D NOE intensities were re-calibrated as the refinement process advanced, according to the CALIBA protocol (Güntert et al., 1991).

#### *Dihedral angle constraints*

The  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$  coupling constants were obtained from the ratio between the intensity of the diagonal peak ( $\nu_{1\text{HN}}$ ,  $\nu_{2\text{N}}$ ,  $\nu_{3\text{HN}}$ ) and that of the cross peak ( $\nu_{1\text{H}\alpha}$ ,  $\nu_{2\text{N}}$ ,  $\nu_{3\text{HN}}$ ) integrated on 3 to 5  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  planes in the HNHA experiment (Vuister and Bax, 1993). They were converted into constraints for the backbone torsion angle  $\phi$  by means of the appropriate Karplus curve (Bax and Wang, 1995). An uncertainty of  $\pm 10^\circ$  was given to all angles. Among possible solutions of the Karplus equations, dihedral angle values were selected to be consistent with those found in structures obtained without the use of these constraints. For 8  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$  values out of 59 a range of accepted dihedral angles larger than  $20^\circ$  was considered.

The  $\psi$  dihedral angles were obtained in the  $^{15}\text{N}$  NOESY-HSQC experiment from the ratio (Gagne' et al., 1994):

$$I_{\text{HNH}\alpha}/I_{\text{HNH}\alpha-1},$$

where  $I_{\text{HNH}\alpha}$  is the intensity of the NOESY cross-peak between an amide proton and the  $\alpha$  proton of the same residue, and, analogously,  $I_{\text{HNH}\alpha-1}$  is the intensity of the same amide proton and the  $\alpha$  proton of the precedent residue. When the value of this ratio was larger than 2.0, a  $\psi$  angle ranging from  $-65$  to  $+5$  was assumed for all residues but Ile, Thr and Ala, for which values between  $-65$  and  $-15$  were assumed. When the ratio was lower than 1.0, the  $\psi$  angle was assumed to be included in the 100 to 170 range for all residues.

Stereospecific assignments of methylene proton pairs were determined from  $^3J_{\text{HNH}\beta}$  values. The latter were obtained from the relative intensity of the two  $\text{H}_\text{N}$ - $\text{H}_\beta$  cross-peaks in the 3D HNHB experiment (Archer et al., 1991).

#### Relaxation rates

Longitudinal relaxation rates of protons were measured from non selective inversion-recovery  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  HSQC experiments (Bertini et al., 1996). The intensities of the signals were plotted versus the recovery delays and fit to a mono-exponential three parameters function. The diamagnetic contribution ( $R_{1\text{dia}}$ ) was subtracted from the experimental relaxation rates ( $R_1^{\text{obs}}$ ) according to the following expression:

$$R_1^{\text{obs}} = R_{1\text{dia}} + R_{1p},$$

where  $R_{1\text{dia}}$  was estimated from the average of the  $R_1^{\text{obs}}$  values for protons far from the metal ion (for which  $R_{1p} = 0$ ). The  $R_{1\text{dia}}$  values used in the present work were  $2.0 \text{ s}^{-1}$  for amide protons and  $1.2 \text{ s}^{-1}$  for protons bound to carbon nuclei. In turn, the obtained  $R_{1p}$  values were plotted versus  $r^{-6}$  ( $r$  being the proton-metal distance) in different steps of the calculations and then converted in to lower and upper distance limits according to the following equation:

$$R_{1p} = K \cdot r^{-6}.$$

The value of  $K$  varies as the degree of resolution is increased. The final  $K$  value used was  $2.6 \times 10^{-55} \text{ s}^{-1} \text{ m}^6$  for both amide and aliphatic protons.

Additionally, the longitudinal relaxation rates of four  $^{13}\text{C}$  (Asp54  $\text{C}\gamma$ , Asn56  $\text{C}\gamma$ , Asp 65  $\text{C}\delta$ , and Val 61  $\text{C}\alpha$ ) nuclei in the CaCeCb derivative were determined and translated into upper and lower distance limits by applying the same methodology explained above. Due to the weaker effect of the hyperfine interaction on the relaxation rates of low  $\gamma$  nuclei (Bertini et al., 2001a), only the above resonances were found to be unambiguously affected. The diamagnetic contribution was estimated to be  $0.7 \text{ s}^{-1}$ .

#### Pseudocontact shifts

Pseudocontact shifts are introduced as constraints in the target function of PSEUDYANA calculations as a sum of differences between the experimental and the calculated pcs for the observed nuclei in each family of structures according to the previously reported procedure (Banci et al., 1998b). The experimental pseudocontact shifts for  $^{15}\text{N}$  and backbone  $^1\text{H}$  of CaLnCb derivatives (Ln = Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Tb,

Dy, Ho, Er, Tm, Yb) were obtained from the observed chemical shifts according to the expression:

$$\delta^{\text{exp}} = \delta^{\text{dia}} + \delta^{\text{pcs}},$$

where  $\delta^{\text{dia}}$  was the chemical shift of the corresponding nucleus in the CaLaCb native protein. Pseudocontact values for  $^{13}\text{C}$  atoms and side chains protons were obtained using the CaCaCb derivative as a diamagnetic analogue. The calculated  $\delta^{\text{pcs}}$  values were obtained by assuming the metal-center point dipole approximation, i.e., by applying Equation (1) to the corresponding nuclei. In turn, the magnetic anisotropy components as well as the orientation of the tensor was recalculated as the refinement of the structures increased, until convergence. The recalculated tensor after each refinement step was obtained using the program FANTASIA (Banci et al., 1997) by omitting the pcs values from the metal ligands as well as those from the nearby residues (57, 62–64).

#### Hydrogen bonds

When the existence of a hydrogen bond was observed in the specific HNCO experiment (Cordier and Grzesiek, 1999) (see above) the following restrictions were given:

$$r_{\text{H}\dots\text{O}} < 2.2 \text{ \AA} \quad \text{and} \quad 2.6 \text{ \AA} < r_{\text{N}\dots\text{O}} < 3.3 \text{ \AA}$$

where  $r_{\text{H}\dots\text{O}}$  and  $r_{\text{N}\dots\text{O}}$  are the distance of the oxygen of the hydrogen bond with the amide proton and its nitrogen nucleus, respectively. The lower distance limits were imposed to keep the linearity of the hydrogen bond.

#### Residual dipolar coupling

The rdc constraints used in the present work are those ones previously reported for the CaCeCb derivative. The procedure followed to obtain them and for their introduction as restraints in PSEUDYANA calculations have been previously reported in detail (Bertini et al., 2001d).

#### Structure calculation

The modified version of the program DYANA (Güntert et al., 1997), called PSEUDYANA (Banci et al., 1998b), which permits the simultaneous use of pcs and of rdc as constraints, was used for the structure calculations. Torsion Angle Dynamics (TAD) combined with a simulated annealing algorithm was used to calculate a family of 200 structures starting from randomly generated conformers in 10000 annealing steps. The quality of structures calculated by

Table 1. Type and number of constraints used in PSEUDYANA calculations

Type of constraints	Number of constraints
Diamagnetic constraints	
NOESY	2146 (1793 meaningful)
1D NOE	30 (13 meaningful)
Hydrogen bonds	15 (30 upper distance limits, 15 lower distance limits)
$\phi$ angle constraints	59
$\psi$ angle constraints	46
$\chi$ angle constraints	86 (used as stereo specific assignment constraints)
Total diamagnetic constraints	2042 meaningful
Paramagnetism-based constraints	
$T_1$	26
rdc	64
pcs (from 11 lanthanides)	1738 (562 N, 573 H <sub>N</sub> , 156 C of Ce <sup>3+</sup> , 447 HC of Ce <sup>3+</sup> )
Metal-ligand constraints	10
Total Paramagnetism-based constraints	1838
Total constraints	3880

PSEUDYANA can be assessed by a properly defined function (target function) proportional to the squared deviations of the calculated constraints from the experimental ones, plus the squared van der Waals contact violations. In DYANA (and in PSEUDYANA as well), the Target Function TF has the role of a pseudo potential energy and is defined such that  $TF = 0$  if and only if all experimental distance constraints and torsion angle constraints are fulfilled and all non-bonded atom pairs satisfy a check for the absence of steric overlap (Güntert et al., 1997). TF values are expressed in  $\text{\AA}^2$ . Mean structures obtained were minimized using the program PSEUDYANA with a 1000 steps conjugate gradient minimization.

The programs MOLMOL and PROCHECK were subsequently used to analyse the calculated structures.

## Results

### NMR assignment

The assignment of the backbone  $^{13}\text{C}$  nuclei in the CaCeCb derivative was extended, as well as that in the native CaCaCb protein, by the analysis of the HNCO and HNCA experiments. These new assignments are included in the overall assignment, which is given in the Supplementary Material section. Furthermore, an HNCO experiment performed with a  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$  ineqpt transfer delay of 66.6 ms (Cordier and Grzesiek, 1999)

allowed us to identify 15 amide protons and their corresponding carbonyl groups to which they are linked through hydrogen bonds.

### NMR constraints

The number of constraints used in PSEUDYANA calculations are given in Table 1. They are grouped according to their origin in diamagnetic and paramagnetism-based constraints. The list of all the new constraints used in the present work is given in the Supplementary Material section.

The diamagnetic constraints contain both short range constraints derived from NOE and  $^3J$  coupling constants and long range constraints derived from the observation of hydrogen bonds. The NOESY constraints used in the present work (1793) are those previously reported (Allegrozzi et al., 2000), without any change in the calibration.

Constraints relative to the  $\phi$ ,  $\psi$  and  $\chi$  dihedral angles (Table 1) were obtained from the measurements of the  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ , the  $I_{\text{HNH}\alpha}/I_{\text{HNH}\alpha-1}$  ratio, and the  $^3J_{\text{HNH}\beta}$  values, respectively. Thirteen 1D NOE meaningful constraints (Table 1) are those used in the previous work (Allegrozzi et al., 2000), but they have been re-calibrated as the resolution of the structure was improving during the calculations.

As in the case of diamagnetic constraints, the paramagnetism-based constraints contain both short range and long range constraints. The former arise

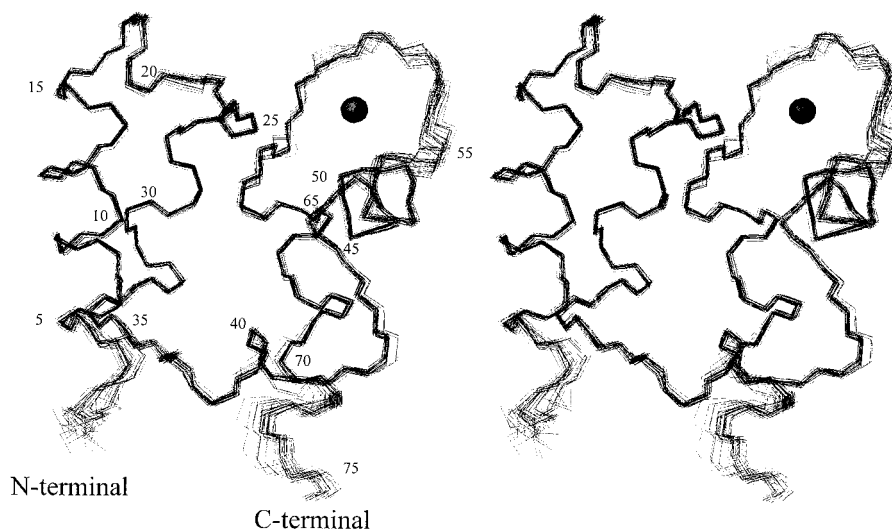


Figure 1. Stereo view of family of accepted conformers (30 structures).

from relaxation rates from signals in the vicinity of the paramagnetic center. Longitudinal relaxation rates corresponding to 22 protons obtained from inversion recovery HSQC experiments and 4 longitudinal relaxation times of  $^{13}\text{C}$  nuclei were introduced as restraints in the structure calculations (Table 1).

As far as long range paramagnetism-based constraints are concerned, 166 pcs from peptide N and NH nuclei and 156 carbon nuclei assigned for the CaCeCb derivative were also introduced as constraints, together with pcs from 969 peptide N and NH obtained from ten different CaLnCb derivatives. Finally, the rdc obtained for 64 NH pairs in the CaCeCb derivative were also included as constraints in the structure calculations.

In total, as it is described in Table 1, 3880 meaningful constraints were used in the structure calculations, the diamagnetic constraints being 52.3%, versus 47.7% arising from the presence of the paramagnetic center.

#### *Solution structure calculations*

Structure calculations were performed with the program PSEUDYANA using the constraints shown in Table 1. The structure consists of four helices and three loops, of which the first and the third constitute the lanthanide-binding site. A stereo view of backbone atoms for the 30 conformers with lowest target function is shown in Figure 1. Such an ensemble of conformers has a root mean square deviation (r.m.s.d.) for the backbone atoms of  $0.25 \pm 0.07 \text{ \AA}$

Table 2. Contribution to the total target function of the final structure of single groups of constraints

Type of constraint	Contribution (%)
<b>Diamagnetic constraints</b>	
Van der Waals	7.4
Hydrogen Bonds	2.3
Tensors	1.0
Angles	3.4
1D NOE	0.0
NOESY	16.3
Total diamagnetic constraints	30.4
<b>Paramagnetism-based constraints</b>	
$T_1$	1.5
pcs*	46.7
rdc	21.4
Total paramagnetism-based constraints	69.6

\*Single contributions of each metal are summarized in Table 3.

(the r.m.s.d. values presented here are all given with regard to the average value). The mean global heavy atom r.m.s.d. for this ensemble of conformers is  $1.09 \pm 0.10 \text{ \AA}$ . Figure 2 (open dots) depicts the r.m.s.d. per residue. Besides C- and N-terminal sites, a slightly larger r.m.s.d. is observed for the three loops with a maximum for the cerium-binding loop. The target function obtained for this family of structures ranges from 1.74 to  $1.90 \text{ \AA}^2$ . The contributions of each kind of constraint to the global value are given

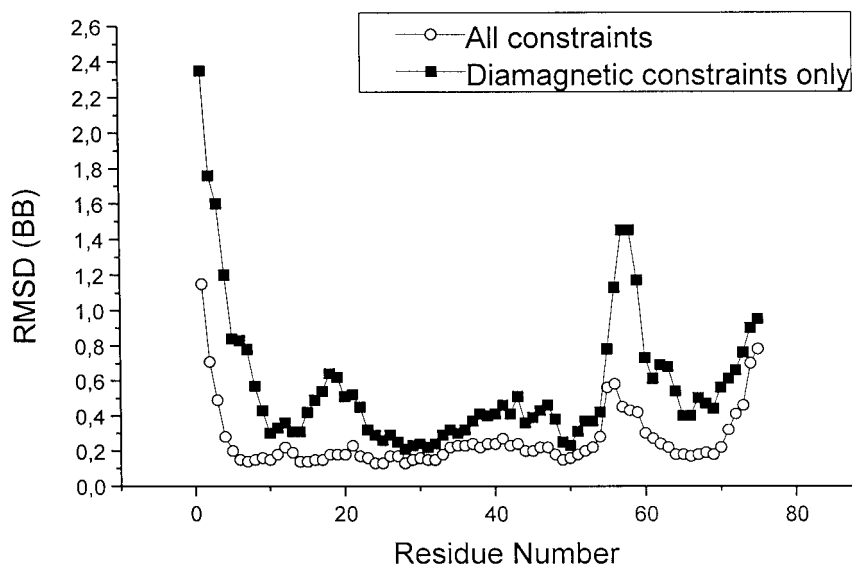


Figure 2. Backbone r.m.s.d. plot of backbone atoms for the structure obtained using only diamagnetic constraints and from that obtained using all available constraints.

in Table 2. Most of the contributions arise from long range paramagnetism-based constraints (68%). This is not surprising since PSEUDYANA (as all structure calculations programs written up to now) is thought to build the protein tertiary structures by modulating local changes, i.e., from short range constraints.

The orientation of the magnetic axes and the magnitude of the main components of the magnetic susceptibility tensor for the CaCeCb derivative are similar to those already reported. In fact, the values obtained in the present work are  $\Delta\chi_{ax} = 2.10 \times 10^{-32} \text{ m}^3$  and  $\Delta\chi_{rh} = 0.80 \times 10^{-32} \text{ m}^3$ , in good agreement with those previously reported ( $\Delta\chi_{ax} = 2.08 \times 10^{-32} \text{ m}^3$  and  $\Delta\chi_{rh} = 0.71 \times 10^{-32} \text{ m}^3$ ) (Bertini et al., 2001b).

Table 3 shows the contribution to the target function of the pcs of each lanthanide ion. It is clear that the high contribution of such set of constraints to the target function is due to the CaCeCb derivative, in agreement with the fact that this derivative is the one with the highest number of constraints, including those arising from non exchangeable protons and from  $^{13}\text{C}$  backbone resonances.

We have analysed the effect that paramagnetism-based constraints (pcs, rdc, and relaxation rates) have both on the final resolution of the family of structures and on the overall target function. In order to do this, we have performed several PSEUDYANA runs eliminating, in each calculation, a class or part of a class of constraints. We have performed in total thirteen of these runs. In Table 4, the r.m.s.d. and target functions

Table 3. Contribution of each metal to the total pcs target function of the final structure

Metal	Contribution (%)
Ce (N, HN)	8.2
Ce (all others)	37.9
Dy	5.6
Er	0.0
Eu	1.7
Ho	10.2
Nd	3.3
Pr	10.1
Sm	9.7
Tb	5.8
Tm	1.0
Yb	6.5

(TF) of the obtained families (all of them of 30 conformers) are given. For all calculations with subsets of constraints, the r.m.s.d. of the corresponding average structure from the final average structure is given.

## Discussion

The effect of introducing different classes of structural constraints in a structure calculation should be considered with respect to two points: (i) the effect of the new



Table 4. Effect of each kind of paramagnetism-based constraint in the final resolution of the structures

Restrains used	r.m.s.d. from the	Structural statistics for the		Ramachandran plot statistics for the			
	final average structure	family of structures		family of structures			
	Backbone r.m.s.d.	Backbone	Target	A	B	C	D
	(Å)	r.m.s.d.	functon (Å <sup>2</sup> )	(%)	(%)	(%)	(%)
All	–	0.25 ± 0.07	1.74–1.90	92.3	7.7	0	0
Without pcs from <sup>1</sup> HC and <sup>13</sup> C	0.32	0.30 ± 0.04	1.32–1.50	92.3	7.7	0	0
Without pcs	0.59	0.43 ± 0.09	0.66–0.74	84.6	15.4	0	0
Without rdc	0.40	0.32 ± 0.07	1.22–1.45	89.2	10.8	0	0
Without T <sub>1</sub>	0.35	0.25 ± 0.07	1.19–1.31	89.2	10.8	0	0
Without short-range pcs	0.41	0.40 ± 0.08	0.92–1.00	90.8	9.2	0	0
Without medium- and long-range pcs	0.44	0.39 ± 0.08	1.12–1.35	91.2	8.8	0	0
Without T <sub>1</sub> and rdc	0.46	0.33 ± 0.05	0.74–0.88	86.2	13.8	0	0
Without T <sub>1</sub> and pcs	0.67	0.54 ± 0.13	0.61–0.69	87.7	12.3	0	0
Without pcs and rdc	0.65	0.55 ± 0.11	0.23–0.33	83.1	16.9	0	0
Without T <sub>1</sub> , rdc, and medium- and long-range pcs	0.61	0.54 ± 0.08	0.43–0.70	90.8	9.2	0	0
Without T <sub>1</sub> , rdc, and short-range pcs	0.45	0.48 ± 0.11	0.43–0.58	87.7	12.3	0	0
Without T <sub>1</sub> , pcs and rdc	0.90	0.61 ± 0.13	0.22–0.30	84.6	15.4	0	0
Without T <sub>1</sub> , pcs, rdc and ligands	1.01	0.69 ± 0.18	0.22–0.32	83.1	15.4	1.5	0

A = most favoured regions.

B = additionally allowed regions.

C = generously allowed regions.

D = disallowed regions.

constraints on the accuracy and precision of the structure and (ii) the consistency with the old constraints. Comparing the structure obtained with the available diamagnetic constraints only with the final structure of Calbindin D<sub>9k</sub>, a significantly lower r.m.s.d. in the latter is observed (from 0.69 to 0.25 Å), which is a measure of the precision of the structure. The overall consistency of the constraints can be appreciated from the fact that the r.m.s.d. decreases in the presence of paramagnetism-based constraints (empty circles in Figure 2) without increasing the target function of the diamagnetic constraints and without any increase in the number of consistent violations (only 2 consistent violations being observed with a 0.1 Å threshold). This proves that the two sets of diamagnetic and paramagnetism-based constraints are fully consistent.

In the following, a series of calculations is presented where several paramagnetism-based constraints are, in turn, removed. These calculations are instructive on the intrinsic value and complementarity of these constraints. Even more importantly, calculations excluding increasing numbers of NOE constraints are also shown. The results are relevant for the general issue of how much non-NOE constraints

can substitute for NOEs in actual solution structure determinations.

Inspection of Table 4 indicates that pcs are important for the final quality of the solution structure. In fact, without these constraints the global r.m.s.d. increases from 0.25 Å to 0.43 Å. Rdc constraints are also important although to a lower degree, the r.m.s.d. increasing from 0.25 Å to 0.32 Å without these constraints. As only 64 rdc values are used vs. about 1700 pcs constraints, their contribution is still remarkable. Furthermore, they improve the quality of the Ramachandran plot of the structure more than the 1738 pcs constraints, as observed in Table 4. This confirms that rdc constraints in general, and those arising from the orientation induced by a paramagnetic center in particular, are precious constraints.

Figure 3 allows us to analyse in a finer detail how pcs and rdc affect the local resolution of the structure. As already discussed in previous works (Bertini et al., 2001b), the combined use of different lanthanides removes the intrinsic limitation provided by a single metal ion to act only within a spherical shell from the metal center whose inner and outer radii are metal ion dependent. The availability of different active shells for different lanthanides allows pcs to be operative all over the protein scaffold, from the region from residue

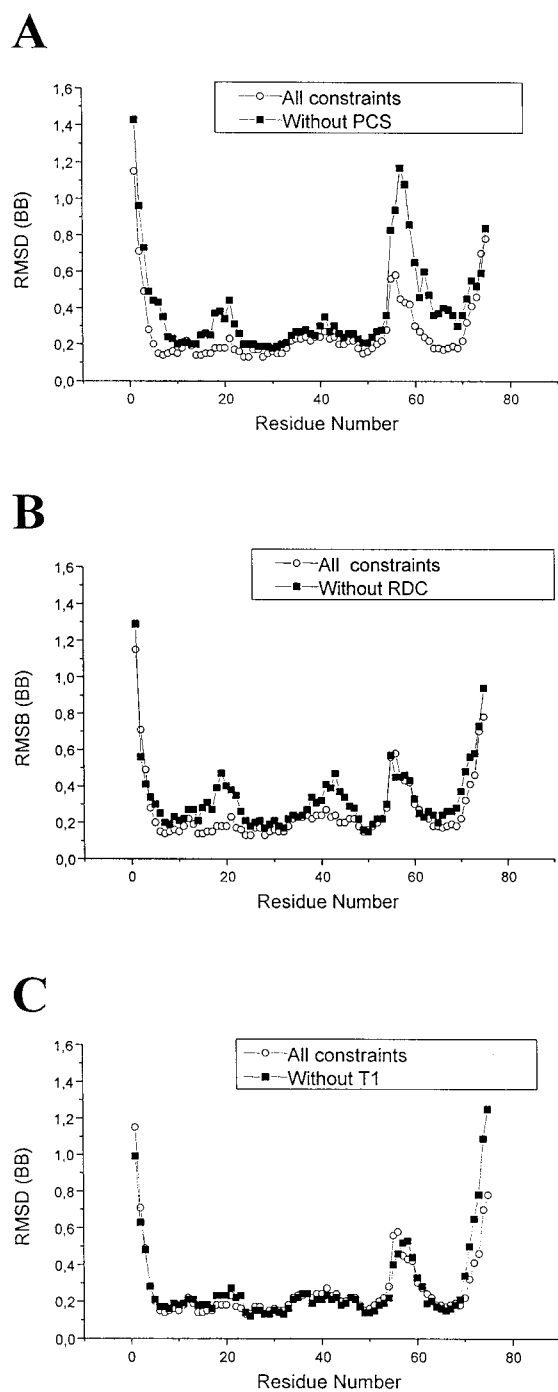


Figure 3. Backbone r.m.s.d. for (A) para vs. para without pcs; (B) para vs. para without rdc; (C) para vs. para without  $T_1$ .

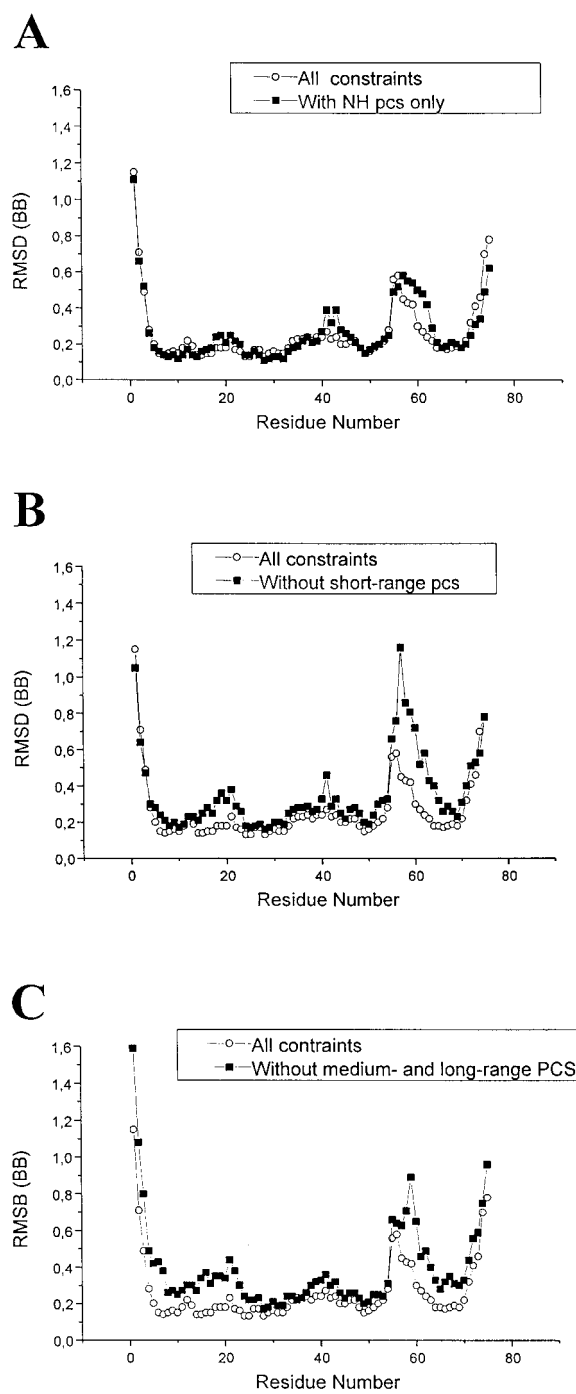


Figure 4. Backbone r.m.s.d. for (A) para vs. para with NH pcs only; (B) para vs. para without short-range pcs; (C) para vs. para without medium- and long-range pcs.

53 to residue 67, encompassing the  $\text{Ln}^{3+}$  binding loop, to the farthest residues in the linker between helices II and III. Figure 3A also shows that pcs constraints are more localized than rdc. Indeed, when rdc are excluded from calculations (Figure 3B), a higher r.m.s.d. is observed all over the molecule. Again, in regions like helix II (residues from 24 to 35) in which the structure is better defined due to dihedral angle constraints, the contribution of rdc to the overall resolution is smaller than in the loop regions. Furthermore, it seems that rdc do not simply affect the residues for which rdc are available. Indeed, even if there are no rdc constraints available for residues 55–62 (but Val 61), the exclusion of the 64 rdc constraints from calculations causes a remarkable increase of local r.m.s.d. in that region.

The 26 constraints arising from  $T_1$  measurements do not, apparently, contribute to decrease the global r.m.s.d. value (Figure 3C). However,  $T_1$  constraints significantly contribute to the quality of the Ramachandran plot, providing an increase of the number of residues falling in the core region. Therefore, although the structure without  $T_1$  has the same r.m.s.d. and a slightly lower target function with respect to the structure with  $T_1$  constraints, the structure obtained including  $T_1$  constraints should be considered as the ‘best’ structure arising from our calculations. On the other hand,  $T_1$  constraints are helpful in the absence of other paramagnetism-based constraints. As shown in Table 4, they provide a decrease of r.m.s.d. from 0.61 Å to 0.55 Å in the absence of other paramagnetism-based constraints. This is almost the same effect provided by rdc.

An interesting result is observed when running PSEUDYANA with the inclusion of only certain categories of pcs constraints. Figure 4A shows the r.m.s.d. diagram obtained when only pcs arising from amide nitrogens and protons are used. It is evident that, in the regions in which a consistent set of amide pcs is available (all but residues 53–63), no substantial improvement in the quality of the structure is provided by the inclusion of  $^{13}\text{C}$  and non-exchangeable protons. The latter, on the other hand, are crucial to refine the region close to the metal site, for which proton relaxation prevents the observation of  $^{15}\text{N}$ -HSQC peaks.

The exclusion from the calculation of one group of amide pcs constraints leads to another interesting conclusion: the structure obtained without short-range pcs (Figure 4B) is globally worse than the structure obtained without long- and medium-range pcs (Figure 4C). This is also apparent from Table 4, in terms

of both global r.m.s.d. and Ramachandran plot. Consistently, the structures obtained with the exclusion of only one group of amide pcs show, as expected, worsening in different regions of the protein. The most striking worsening by the exclusion of short-range pcs ( $\text{Ln} = \text{Ce}, \text{Pr}, \text{Nb}, \text{Eu}, \text{Sm}$ ) from the structure is seen in the second metal binding loop, which shows a peak in the local r.m.s.d. of above 1.2 Å. As expected, the exclusion of medium- and long-range pcs ( $\text{Ln} = \text{Er}, \text{Yb}, \text{Tb}, \text{Dy}, \text{Ho}, \text{Tm}$ ) causes a less drastic increase of r.m.s.d. in the  $\text{Ln}^{3+}$  binding loop (Figure 4C). The sphere of action of each individual class of paramagnetism-based constraints can be further clarified by comparing the local r.m.s.d. values when one class only is inserted (Figures 5A–C).

We should finally comment on the contribution provided by the identification of lanthanide-bound residues obtained by using direct detection  $^{13}\text{C}$  experiments (Bertini et al., 2001a). This is the first time that these constraints are considered in the solution structure calculation of a metalloprotein. Constraints derived by metal coordination significantly reduce the local r.m.s.d. in the binding loop (Figure 5D), which decreases from a maximum value of about 2.1 Å to about 1.5 Å. Overall, their effect is quite similar to that obtained by the employment of  $T_1$  constraints although, at variance with the latter, they also contribute to the overall improvement of general statistics, as shown in Table 4.

Inspection of the diagrams of the r.m.s.d. per residue for the backbone protons of the  $\text{CaLnCb}$  families, obtained with different groups of constraints, shows an interesting behavior of the  $\text{Ca}^{2+}$  binding loop (loop I) of the protein: while the exclusion of either pcs or rdc in two different runs leads to a modest and comparable worsening in the quality of the structure (Figures 3A and 3B) in that region, the exclusion of both groups of paramagnetism-based constraints yields a drastic increase of the r.m.s.d. per residue (Figure 5C). This demonstrates a useful complementarity of rdc and pcs constraints. It should be remembered that no assumptions have been made about the coordination of  $\text{Ca}^{2+}$  in the first metal binding loop. This loop is a good example of intrinsic scarcity of diamagnetic constraints due to the presence of an NMR-silent region of the protein.

In Table 4 is also reported the r.m.s.d. between each average structure obtained with subsets of constraints and the average final structure. The exclusion of a subset of constraints from calculations not only leads to a family with a higher r.m.s.d., but also

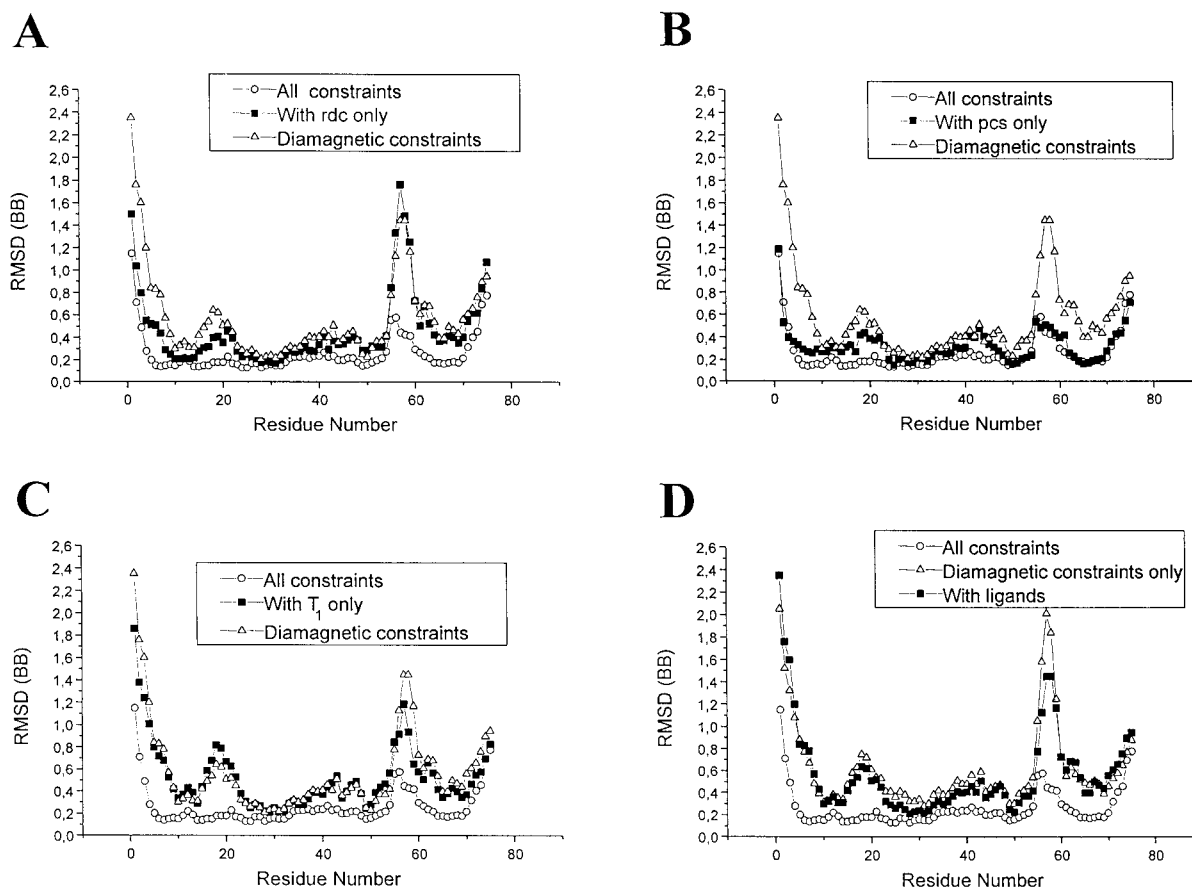


Figure 5. Backbone r.m.s.d. for (A) para vs. dia and para with rdc only; (B) para vs. dia and para with pcs only; (C) para vs. dia and para with  $T_1$  only; (D) para vs. dia and para with ligands only.

bears to a mean structure different from the one obtained with all constraints. This means that a subset of constraints affects not only the precision, but also the accuracy of the final family (Zhao and Jardetzky, 1994). In fact it is implicit that, if the accuracy was not affected by the inclusion of subsets of constraints, the mean structures obtained with or without them would have been identical. The above analysis has shown that paramagnetism-based constraints are certainly valuable in structure refinement, as they show a certain degree of complementarity, and their variety (and tunability by the use of different metal ions) can be exploited to design the best experimental strategy for a given system. We address now the issue of their suitability *as substitutes for NOE constraints*. To do so, several calculations have been performed by retaining all paramagnetism-based constraints and by removing increasing numbers of NOEs.

The results are illustrated in Figure 6. The first calculation has been performed by removing all but

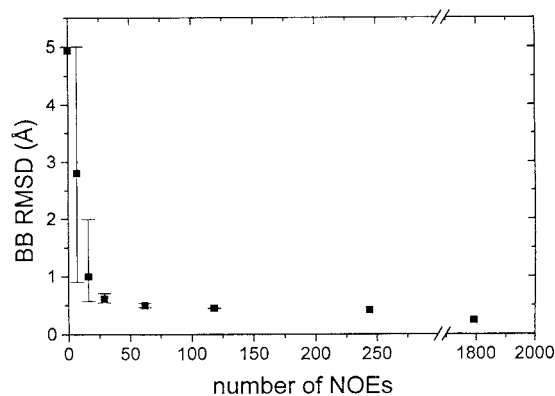


Figure 6. Backbone r.m.s.d. for the structure obtained using all the paramagnetism-based constraints and an increasing number of NOEs.

long range NOEs. This decreased the total number of NOE constraints from 1793 to 244. The resulting family has target function values in the range 0.8–1.1, i.e.,

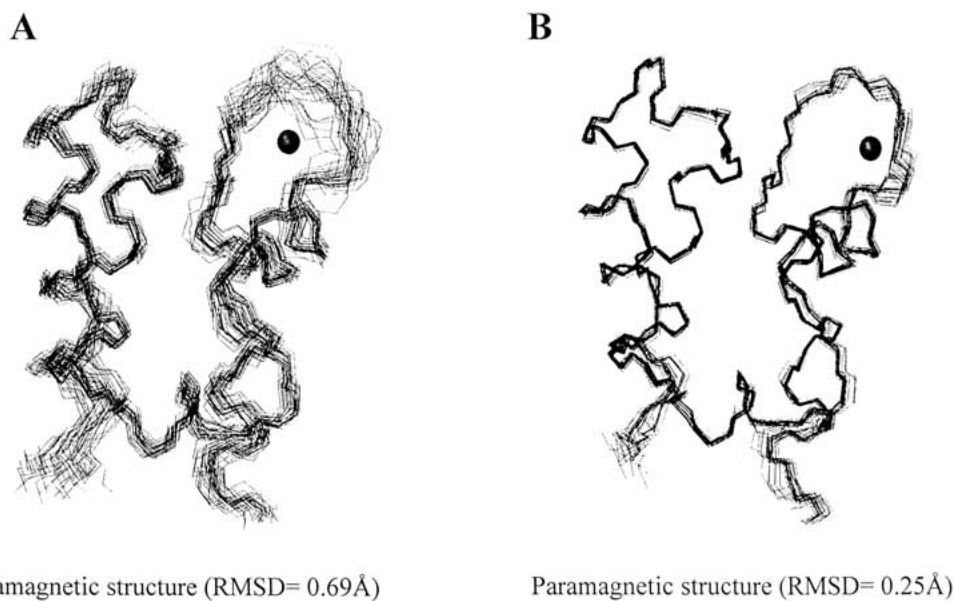


Figure 7. Family of 30 conformers obtained with diamagnetic (A) and paramagnetism-based (B) constraints.

sensibly smaller than the reference solution structure family, and backbone r.m.s.d. of 0.41 Å (compared to 0.25 Å of the best structure). By removing further long range NOEs at random, the target function remains small and the backbone r.m.s.d. increases, but the quality of the structure, as judged from the r.m.s.d., remains acceptable until the NOEs are reduced to very small numbers. It is a striking result that the r.m.s.d. remains below 1 with the use of as few as 29 NOEs. The error bars in Figure 6 give an idea of the variability of the results when different sets of NOEs are randomly selected. When all NOEs are removed, however, the r.m.s.d. jumps to above 5 Å, and the family bears only a vague resemblance to the original high resolution family. r.m.s.d. values of 0.91 Å are found even when the NOEs are reduced to 7, if they are chosen to involve atoms from all the four helices in the protein. This is not surprising, since the fact that only few distances are needed to position helices with respect to each other was already known in literature, as in the case of the ‘heuristic refinement method’ (Altman and Jardetzky, 1989; Brinkley et al., 1998).

It should be recalled that, besides NOE constraints, the diamagnetic constraints include dihedral angles, which are crucial in determining the secondary structure elements (four helices in the present case). These constraints have been retained in all calculations shown in Figure 6. This choice is based on the consideration that the Chemical Shift Index

(CSI) may provide dihedral angles as well. To answer the question of their relative importance with respect to paramagnetism-based constraints in yielding a reasonable well resolved family with just 7 NOEs, the same calculations was repeated without paramagnetism-based constraints. Again, a r.m.s.d. larger than 4 Å was obtained in all cases.

## Conclusions

Until the present work, structures of paramagnetic proteins obtained so far showed a somewhat larger r.m.s.d. on the region encompassing the metal ion. Such a behavior depends on the balance between the loss of information due to the presence of the paramagnetic center and the gain of information due to the same paramagnetic center. We show here that advantages may effectively overcome drawbacks. This is reflected in the actual values of local r.m.s.d. Overall, the above data put into evidence how synergistic can be the role of the different contributions arising from paramagnetism.

To summarize, the overall effect on the solution structure, solved with a given set of diamagnetic constraints, of the introduction of paramagnetism-based constraints for a protein containing a paramagnetic ion, is shown in Figure 7. For the first time, pcs and rdc were merged with short range information, arising from the identification of lanthanide ligands and

from  $T_1$  values (Bertini et al., 2001a). The increase in resolution in the close proximity of the paramagnetic center as a consequence of paramagnetism-based constraints is a well known and expected feature. On the other hand, the increase of resolution in backbone regions like the N- and C-terminal sites, usually loosely characterized, is clear from Figure 7. The resolution for the diamagnetic protein CaCaCb is of course higher than that obtained for CaCeCb (Figure 7A) by using diamagnetic constraints only.

Conversely, the paramagnetism-based constraints alone produce an unresolved structure (r.m.s.d. of about 5). However, the concomitant use of paramagnetism-based constraints, angular constraints (including intra-helix hydrogen bonds) and a few long range NOEs is able to provide reasonable results (Figure 6). Since the angular constraints can be essentially obtained through the chemical shift index, a few long range constraints, which may well depend on the particular nature of the protein, provide acceptable results. The present research represents, *inter alia*, a hint toward solution structure determinations without NOEs.

## Acknowledgements

This research has been financially supported under the RTD projects ('FIND Structure' contract QLG2-CT-1999-01003) and ('Transient NMR' contract HPRI-CT-1999-50006). Support to AD under the 'Access to Infrastructure' programme (PARABIO LSF contract HPRI-CT-1999-00009) and to BJ ('Marie Curie Training Site' contract HPMT-CT-2000-00137) are also acknowledged. AD thanks the 'Generalitat Valenciana' (Conselleria de Educacion y Ciencia) for a grant.

## References

- Allegrozzi, M., Bertini, I., Janik, M.B.L., Lee, Y.-M., Liu, G. and Luchinat, C. (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 4154–4161.
- Altman, R.B. and Jardetzky, O. (1989) *Meth. Enzymol.*, **177**, 218–246.
- Archer, S.J., Ikura, M., Torchia, D.A. and Bax, A. (1991) *J. Magn. Reson.*, **95**, 636–641.
- Banci, L., Bertini, I., Bren, K.L., Cremonini, M.A., Gray, H.B., Luchinat, C. and Turano, P. (1996) *JBIC*, **1**, 117–126.
- Banci, L., Bertini, I., Gori Savellini, G., Romagnoli, A., Turano, P., Cremonini, M.A., Luchinat, C. and Gray, H.B. (1997) *Proteins Struct. Funct. Genet.*, **29**, 68–76.
- Banci, L., Bertini, I., Huber, J.G., Luchinat, C. and Rosato, A. (1998a) *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 12903–12909.
- Banci, L., Bertini, I., Cremonini, M.A., Gori Savellini, G., Luchinat, C., Wüthrich, K. and Güntert, P. (1998b) *J. Biomol. NMR*, **12**, 553–557.
- Bax, A. and Tjandra, N. (1997) *J. Biomol. NMR*, **10**, 289–292.
- Bax, A. and Wang, A.C. (1995) *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 1810–1813.
- Bertini, I., Capozzi, F., Luchinat, C., Piccioli, M. and Vila, A.J. (1994) *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 651–660.
- Bertini, I., Couture, M.M.J., Donaire, A., Eltis, L.D., Felli, I.C., Luchinat, C., Piccioli, M. and Rosato, A. (1996) *Eur. J. Biochem.*, **241**, 440–452.
- Bertini, I., Lee, Y.-M., Luchinat, C., Piccioli, M. and Poggi, L. (2001a) *ChemBioChem*, **2**, 550–558.
- Bertini, I., Janik, M.B.L., Lee, Y.-M., Luchinat, C. and Rosato, A. (2001b) *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 4181–4188.
- Bertini, I., Luchinat, C. and Piccioli, M. (2001c) *Meth. Enzymol.*, **339**, 314–340.
- Bertini, I., Janik, M.B.L., Liu, G., Luchinat, C. and Rosato, A. (2001d) *J. Magn. Reson.*, **148**, 23–30.
- Bertini, I., Luchinat, C., Parigi, G. and Walker, F.A. (1999) *JBIC*, **4**, 515–519.
- Brinkley, J.F., Altman, R.B., Duncan, B.S., Buchanan, B.G. and Jardetzky, O. (1998) *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **28**, 194–210.
- Brodin, P., Grundstrom, T., Hofmann, T., Drakenberg, T., Thulin, E. and Forsén, S. (1986) *Biochemistry*, **25**, 5371–5377.
- Chazin, W.J., Kördel, J., Drakenberg, T., Thulin, E., Brodin, P., Grundstrom, T. and Forsén, S. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 2195–2198.
- Cordier, F. and Grzesiek, S. (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 1601–1602.
- Eccles, C., Güntert, P., Billeter, M. and Wüthrich, K. (1991) *J. Biomol. NMR*, **1**, 111–130.
- Gagne', R.R., Tsuda, S., Li, M.X., Chandra, M., Smillie, L.B. and Sykes, B.D. (1994) *Protein Sci.*, **3**, 1961–1974.
- Granot, J. (1982) *J. Magn. Reson.*, **49**, 257–270.
- Güntert, P. and Wüthrich, K. (1991) *J. Biomol. NMR*, **1**, 447–456.
- Güntert, P., Braun, W. and Wüthrich, K. (1991) *J. Mol. Biol.*, **217**, 517–530.
- Güntert, P., Mumenthaler, C. and Wüthrich, K. (1997) *J. Mol. Biol.*, **273**, 283–298.
- Hus, J.C., Marion, D. and Blackledge, M. (2000) *J. Mol. Biol.*, **298**, 927–936.
- Johansson, C., Brodin, P., Grundstrom, T., Thulin, E., Forsén, S. and Drakenberg, T. (1990) *Eur. J. Biochem.*, **187**, 455–460.
- Kay, L.E., Ikura, M., Tschudin, R. and Bax, A. (1990) *J. Magn. Reson.*, **89**, 496–514.
- Kay, L.E., Marion, D. and Bax, A. (1989) *J. Magn. Reson.*, **84**, 72–84.
- Kechuan, T. and Gochin, M. (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 9276–9285.
- Kurland, R.J. and McGarvey, B.R. (1970) *J. Magn. Reson.*, **2**, 286–301.
- La Mar, G.N. and de Ropp, J.S. (1993) In *Biological Magnetic Resonance*, Vol. 12, Berliner, L.J. and Reuben, J., Eds., Plenum Press, New York, NY, pp. 1–78.
- Linse, S., Brodin, P., Drakenberg, T., Thulin, E., Sellers, P., Elm-den, K., Grundstrom, T. and Forsén, S. (1987) *Biochemistry*, **26**, 6723–6735.
- Malmendal, A., Carlström, G., Hambræus, C., Drakenberg, T., Forsén, S. and Akke, M. (1998) *Biochemistry*, **37**, 2586–2595.
- Reif, B., Hennig, M. and Griesinger, C. (1997) *Science*, **276**, 1230–1233.
- Salzmann, M., Wider, G., Pervushin, K., Senn, H. and Wüthrich, K. (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 844–848.

- Shaka, A.J., Barker, P.B. and Freeman, R. (1985) *J. Magn. Reson.*, **64**, 547–552.
- Tjandra, N., Grzesiek, S. and Bax, A. (1996) *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 6264–6272.
- Tjandra, N., Omichinski, J.G., Gronenborn, A.M., Clore, G.M. and Bax, A. (1997) *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 732–738.
- Tolman, J.R., Flanagan, J.M., Kennedy, M.A. and Prestegard, J.H. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9279–9283.
- Vold, R.R. and Prosser, P.S. (1996) *J. Magn. Reson. Ser. B* **113**, 267–271.
- Vuister, G.W. and Bax, A. (1993) *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7772–7777.
- Wilkens, S.J., Xia, B., Volkman, B.F., Weinhold, F., Markley, J.L. and Westler, W.M. (1998) *J. Phys. Chem.*, **102**, 8300–8305.
- Wishart, D.S., Sykes, B.D. and Richards, F.M. (1991) *J. Mol. Biol.*, **222**, 311–333.
- Wüthrich, K. (1996) In *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*, Grant, D.M. and Harris, R.K., Eds., John Wiley & Sons, Chichester, pp. 932–939.
- Yamazaki, T., Tochio, H., Furui, J., Aimoto, S. and Kyogoku, Y. (1997) *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 872–880.
- Zhao, D. and Jardetzky, O. (1994) An assessment of the precision and accuracy of protein structures determined by NMR. *J. Mol. Biol.*, **239**, 601–607.

## Metal–Ligand Interplay in Blue Copper Proteins Studied by $^1\text{H}$ NMR Spectroscopy: Cu(II)–Pseudoazurin and Cu(II)–Rusticyanin

Antonio Donaire,<sup>†</sup> Beatriz Jiménez,<sup>§</sup> Claudio O. Fernández,<sup>#</sup> Roberta Pierattelli,<sup>×</sup> Tomotake Niizeki,<sup>‡</sup> José-María Moratal,<sup>§</sup> John F. Hall,<sup>||</sup> Takamitsu Kohzuma,<sup>‡</sup> S. Samar Hasnain,<sup>||,∇</sup> and Alejandro J. Vila<sup>\*,‡</sup>

Contribution from the Biophysics Section and Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR), University of Rosario, Suipacha 531, S2002LRK Rosario, Argentina, Centro de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández, Edificio Torregaitán, Avda. Ferrocarril s/n, 03202-Elche (Alicante), Spain, Departamento de Química Inorgánica, Universitat de València, C/ Dr. Moliner, 50, 46100-Burjassot (Valencia), Spain, LANAIS RMN-300, University of Buenos Aires-CONICET, Junín 956, C1113AAD Buenos Aires, Argentina, Department of Chemistry and CERM, Via L. Sacconi, 6-50019 Sesto Fiorentino, Italy, Department of Chemistry, Faculty of Science, Ibaraki University, Mito, Ibaraki 310-8512, Japan, The Cell Signaling Laboratory, Department of Biological Sciences, De Monfort University, The Gateway, Leicester LE1 9BH, U.K., and CCLRC Daresbury Laboratory, Warrington, Cheshire WA4 4AD, U.K.

Received April 26, 2002

**Abstract:** The blue copper proteins (BCPs), pseudoazurin from *Achromobacter cycloclastes* and rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans*, have been investigated by  $^1\text{H}$  NMR at a magnetic field of 18.8 T. Hyperfine shifts of the protons belonging to the coordinated ligands have been identified by exchange spectroscopy, including the indirect detection for those resonances that cannot be directly observed (the  $\beta\text{-CH}_2$  of the Cys ligand, and the NH amide hydrogen bonded to the  $\text{S}_\gamma(\text{Cys})$  atom). These data reveal that the Cu(II)–Cys interaction in pseudoazurin and rusticyanin is weakened compared to that in classic blue sites (plastocyanin and azurin). This weakening is not induced by a stronger interaction with the axial ligand, as found in stellacyanin, but might be determined by the protein folding around the metal site. The average chemical shift of the  $\beta\text{-CH}_2$  Cys ligand in all BCPs can be correlated to geometric factors of the metal site (the Cu– $\text{S}_\gamma(\text{Cys})$  distance and the angle between the  $\text{CuN}_{\text{His}}\text{N}_{\text{His}}$  plane and the Cu– $\text{S}_\gamma(\text{Cys})$  vector). It is concluded that the degree of tetragonal distortion is not necessarily related to the strength of the Cu(II)– $\text{S}_\gamma(\text{Cys})$  bond. The copper–His interaction is similar in all BCPs, even for the solvent-exposed His ligand. It is proposed that the copper  $xy$  magnetic axes in blue sites are determined by subtle geometrical differences, particularly the orientation of the His ligands. Finally, the observed chemical shifts for  $\beta\text{-CH}_2$  Cys and Ser NH protons in rusticyanin suggest that a less negative charge at the sulfur atom could contribute to the high redox potential (680 mV) of this protein.

### Introduction

Blue copper proteins (BCPs) are electron-transfer mononuclear copper proteins distinguished by their unique spectroscopic features and high redox potentials compared to those of normal Cu(II) complexes.<sup>1–6</sup> The unusual spectroscopic proper-

ties of BCPs in the oxidized state, namely, an intense ligand-to-metal charge-transfer band in the visible absorption spectrum and a small  $A_{||}$  hyperfine coupling constant in the EPR signal, have been attributed to the high covalence of the conserved Cu(II)– $\text{S}_\gamma(\text{Cys})$  moiety.<sup>4,7</sup> The coordination sphere of the copper ion in BCPs is completed by two histidine residues and a weaker, axial ligand interaction, which is a Met residue in most cases (Figure 1).

The high redox potentials of BCPs have been attributed to the soft–soft stabilizing interaction between the reduced copper

\* Address correspondence to this author. Phone: +54-341-4350596. Fax: +54-341-4390465. E-mail: vila@arnet.com.ar/avila@fbiioyf.unr.edu.ar.

<sup>‡</sup> University of Rosario.

<sup>†</sup> Universidad Miguel Hernández.

<sup>§</sup> Universitat de València.

<sup>#</sup> University of Buenos Aires-CONICET.

<sup>×</sup> University of Florence.

<sup>‡</sup> Ibaraki University.

<sup>||</sup> De Monfort University.

<sup>∇</sup> CCLRC Daresbury Laboratory.

(1) Adman, E. T. *Adv. Protein Chem.* **1991**, *42*, 144–197.

(2) Messerschmidt, A. *Struct. Bonding* **1998**, *90*, 37–68.

(3) Gray, H. B.; Winkler, J. R. *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 537–561.

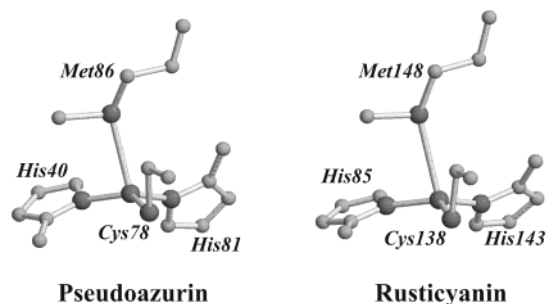
(4) Randall, D. W.; Gamelin, D. R.; LaCroix, L. B.; Solomon, E. I. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 16–19.

(5) Gray, H. B.; Malmström, B. G.; Williams, R. J. P. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 551–559.

(6) Vila, A. J.; Fernandez, C. O. In *Handbook of Metalloproteins*; Bertini, I., Sigel, H., Eds.; Marcel Dekker: New York, 2001; pp 813–856.

(7) Shadle, S. E.; Penner-Hahn, J. E.; Schugar, H. J.; Hedman, B.; Hodgson, D. J.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 767–776.





**Figure 1.** Schematic representation of the metal site in Cu(II)–pseudoazurin from *Achromobacter cycloclastes*, from the PDB file 1bqk,<sup>40</sup> and Cu(II)–rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans*, from the PDB file 1rcy.<sup>41</sup>

ion and the  $S_{\gamma}$ (Cys) atom, and to the existence of a strained and destabilizing coordination for the copper(II) form.<sup>5,8</sup> It has also been suggested that the long Cu– $S_{Met}$  bond allied to the short Cu– $S_{\gamma}$ (Cys) bond destabilizes the oxidized state more than the reduced state.<sup>4,9</sup> These ideas have been challenged recently, since the redox potential of a partially unfolded azurin possesses a higher redox potential than the protein in its native conformation; i.e., the protein folding destabilizes, at least partially, the reduced state.<sup>10,11</sup>

Solomon and co-workers have provided a detailed picture of the electronic structure of the metal ion in blue copper sites.<sup>4</sup> These studies led them to classify type 1 sites as “classic” and “perturbed” sites.<sup>4,12</sup> Classic blue copper sites (those present in plastocyanin, amicyanin, and azurin) exhibit an intense absorption feature at  $\sim 600$  nm, a weak band at  $\sim 450$  nm, and axial EPR spectra. These centers are characterized by a weak bonding interaction with an axial methionine ligand.<sup>1–6</sup> Perturbed centers can be distinguished by an increased absorption of the 450 nm band (with a concomitant decrease in the 600 nm blue band intensity) and rhombic EPR spectra. These perturbations are generally attributed to stronger copper–axial ligand interactions.<sup>13</sup> Perturbed centers can arise from a tetrahedral distortion, when a Gln ligand replaces the Met (stellacyanin), or from a tetragonal distortion with an axial Met ligand (pseudoazurin, cucumber basic protein, and nitrite reductase). Nitrite reductases (NiRs) have recently offered an opportunity to study an “ultimate” tetragonally perturbed site (green), where two classes of nitrite reductases (green and blue) have been crystallographically characterized.<sup>14,15</sup> The structures of the type 1 Cu sites of the green and blue NiRs resemble each other very closely. There are only small differences in the Cu–ligand distances, including those for methionine, in which such differences had been suggested as a reason for the differences in color.<sup>16</sup> Previously, the dominant geometric factor affecting the electronic structure

was proposed to be coupled angular changes in the positions of the Cys and Met ligands.<sup>17</sup> In blue NiRs, there is a lateral displacement (0.76 Å) of the methionine ligand with respect to its position in the green NiRs, which produces angular differences between the two sites.<sup>15</sup> However, the two structures show no difference in their Cys–Cu–Met angles, but the HisC–Cu–Met angle is  $115^\circ$  in the blue vs  $132^\circ$  in the green nitrite reductase. [Note: HisC and HisN refer to the C- and N-terminal histidine ligands, respectively.] For both of these, displacement of the Cu atom with respect to the strong ligands is essentially the same (0.5 Å in blue NiR vs 0.6 Å in green NiR). Dodd et al.<sup>15</sup> have proposed that the HisC–Cu–Met angle, among other subtle factors, accounts for the differences in color for the two groups of NiRs which contain an otherwise “classical” blue Cu center. Solomon et al. have proposed that deviation from a  $C_{3v}$  geometry toward tetragonal distortion in type 1 copper(II) centers can be quantified by the angle  $\phi$  between the  $N_{His}CuN_{His}$  and  $S_{Cys}CuS_{Met}$  planes.<sup>4,12</sup>

NMR is able to probe the electronic structure of each copper–ligand interaction, allowing us to extend further our understanding of the spectroscopic and thermodynamic properties of copper(II) in BCPs, and facilitate the rationalization of how the protein folding and the environment determine the metal site geometry. The oxidized state of BCPs is paramagnetic.<sup>18</sup> NMR has proven to be a fruitful technique for the study of the paramagnetic centers of electron-transfer metalloproteins such as cytochromes and iron–sulfur proteins, since it yields information on the electron spin density on the metal ligands, providing a complementary view of the electronic structure of these metal sites.<sup>19,20</sup> In the past few years, the study of copper(II) centers has been advanced by work from the laboratories of Canters and Bertini,<sup>21–24</sup> opening the possibility of retrieving the unpaired spin density in all copper ligands without the need for metal substitution.<sup>25–34</sup>

- (8) Malmström, B. G. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *233*, 711–718.  
 (9) Guckert, G. A.; Lowery, M. D.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2817–2844.  
 (10) Winkler, J.; Wittung-Stafshede, P.; Leckner, J.; Malmström, B.; Gray, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 4246–4249.  
 (11) Wittung-Stafshede, P.; Hill, M. G.; Gomez, E.; Di Bilio, A. J.; Karlson, B. G.; Leckner, J.; Winkler, J. R.; Gray, H. B.; Malmström, B. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, *3*, 367–370.  
 (12) LaCroix, L. B.; Randall, D. W.; Nersissian, A. M.; Hoitink, C. W. G.; Canters, G. W.; Valentine, J. S.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9621–9631.  
 (13) van Gastel, M.; Canters, G. W.; Krukpa, H.; Messerschmidt, A.; de Waal, E. C.; Warmerdam, G. C. M.; Groenen, E. J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2322–2328.  
 (14) Murphy, M. E.; Turley, S.; Kukimoto, M.; Nishiyama, M.; Horinouchi, S.; Sasaki, H.; Tanokura, M.; Adman, E. T. *Biochemistry* **1995**, *34*, 12107–12117.  
 (15) Dodd, F. E.; Van Beeumen, J.; Eady, R. R.; Hasnain, S. S. *J. Mol. Biol.* **1998**, *282*, 369–382.

- (16) Adman, E. T.; Godden, J. E.; Turley, S. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 27458–27474.  
 (17) LaCroix, L. B.; Shadle, S. E.; Wang, Y. N.; Averill, B. A.; Hedman, B.; Hodgson, K. O.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7755–7768.  
 (18) Banci, L.; Pierattelli, R.; Vila, A. J. *Adv. Protein Chem.* **2002**, in press.  
 (19) Bertini, I.; Turano, P.; Vila, A. J. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2833–2932.  
 (20) Bertini, I.; Luchinat, C. *NMR of paramagnetic substances*, 1st ed.; Coordination Chemistry Reviews 150; Elsevier: Amsterdam, 1996.  
 (21) Kalverda, A. P.; Salgado, J.; Dennison, C.; Canters, G. W. *Biochemistry* **1996**, *35*, 3085–3092.  
 (22) Bertini, I.; Ciurli, S.; Dikuy, A.; Luchinat, C.; Martini, G.; Safarov, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2037–2046.  
 (23) Bertini, I.; Fernandez, C. O.; Karlson, B. G.; Leckner, J.; Luchinat, C.; Malmström, B. G.; Nersissian, A. M.; Pierattelli, R.; Shipp, E.; Valentine, J. S.; Vila, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3701–3707.  
 (24) Bertini, I.; Bryant, D. A.; Ciurli, S.; Dikuy, A.; Fernandez, C. O.; Luchinat, C.; Safarov, N.; Vila, A. J.; Zhao, J. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 47217–47226.  
 (25) Moratal Mascarell, J. M.; Salgado, J.; Donaire, A.; Jimenez, H. R.; Castells, J. *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 3587–3588.  
 (26) Vila, A. J. *FEBS Lett.* **1994**, *355*, 15–18.  
 (27) Salgado, J.; Jimenez, H. R.; Donaire, A.; Moratal, J. M. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *231*, 358–369.  
 (28) Piccioli, M.; Luchinat, C.; Mizoguchi, T. J.; Ramirez, B. E.; Gray, H. B.; Richards, J. H. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 737–742.  
 (29) Vila, A. J.; Fernandez, C. O. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7291–7298.  
 (30) Salgado, J.; Jimenez, H. R.; Moratal, J. M.; Kroes, S. J.; Warmerdam, G. C. M.; Canters, G. W. *Biochemistry* **1996**, *35*, 1810–1819.  
 (31) Fernandez, C. O.; Sannazzaro, A. I.; Vila, A. J. *Biochemistry* **1997**, *36*, 10566–10570.  
 (32) Donaire, A.; Salgado, J.; Moratal, J. M. *Biochemistry* **1998**, *37*, 8659–8673.  
 (33) Salgado, J.; Kroes, S. J.; Berg, A.; Moratal, J. M.; Canters, G. W. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 177–185.  
 (34) Salgado, J.; Kalverda, A. P.; Diederix, R. E. M.; Canters, G. W.; Moratal, J. M.; Lawler, A. T.; Dennison, C. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*, 457–467.

Cu(II)–plastocyanin (Pc),<sup>22</sup> Cu(II)–azurin (Az), and Cu(II)–stellacyanin (St)<sup>23</sup> have been studied with these techniques. These studies have provided direct evidence of the interplay between the strength of the copper–axial ligand interaction and the copper–Cys covalence (which is reflected in large variations in the observed shifts of the Cys proton resonances). This behavior was described for the classic blue sites (plastocyanin and azurin) or tetrahedrally perturbed sites (stellacyanin). In tetragonally perturbed blue copper centers, the axial Met ligand is generally closer to the copper ion than in classic sites, with the main perturbation arising from a different orientation of the Cys and Met ligands with respect to the His residues.<sup>4</sup>

No NMR study of blue sites with tetragonal distortion has been reported. Therefore, we decided to study two BCPs with tetragonally distorted copper sites, pseudoazurin (PsAz)<sup>35</sup> and rusticyanin (Rc),<sup>36–39</sup> by performing <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of the oxidized species at high magnetic fields (18.8 T). The absorption and EPR spectra of PsAz and Rc are similar, even though there are significant differences in the Cu–S<sub>γ</sub>(Cys) and Cu–S<sub>δ</sub>(Met) bond lengths.<sup>40,41</sup> NMR experiments were thus designed to explore the similarities and subtle differences between these two closely related copper sites, which could then be analyzed in the context of the BCPs family. An additional reason for the interest in studying Rc was its high redox potential (680 mV),<sup>39,42</sup> which has been attributed to the highly hydrophobic environment of the metal site<sup>36,41,43,44</sup> and the presence of a serine next to the N-terminal His ligand.<sup>45,46</sup>

In this work, we address the following issues: (1) Can the subtle differences between PsAz and Rc be monitored by NMR, and what can be learned from this spectroscopy? (2) How does the tetragonal distortion in blue copper sites impact the unpaired spin density in the metal ligands? (3) Is there a correlation between the chemical shifts of the Cys protons and the geometrical features of the Cu(II)–Cys moiety in different BCPs? (4) Are there structural factors in the metal site geometry that contribute to a high redox potential in Rc?

## Materials and Methods

**Protein Purification and Metal Derivatives.** Pseudoazurin from *Achromobacter cycloclastes* IAM 1013 was purified as previously described.<sup>47</sup> The final absorbance ratio A<sub>282</sub>/A<sub>594</sub> was 1.45. Recombinant rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans* was expressed and purified from transformed *Escherichia coli* strains BL21(DE3) cultures as already described.<sup>39</sup>

**NMR Spectroscopy.** Samples (~2–5 mM) for NMR experiments were concentrated using Centricon-10 (Millipore) units. A small amount of reduced protein (≤5%) was enough to perform the exchange NMR experiments. D<sub>2</sub>O solutions were prepared by exchanging the solvent in Centricon-10 units. All chemical shifts were referenced to the chemical shift of the residual water (HOD) at the appropriate temperature according to the relationship  $\delta_{\text{HOD}} = -0.012t + 5.11$  ppm, where  $t$  is the temperature (in °C).<sup>48</sup>

NMR spectra were recorded on an Avance 800 spectrometer operating at a proton frequency of 800.13 MHz. Saturation-transfer experiments in solutions containing Cu(II)– and Cu(I)–pseudoazurin or rusticyanin were performed using an *on–off* scheme where *on* values varied from –100 to 2000 ppm and *off* values were positioned symmetrically to the *on* values with respect either to the residual water signal or to the medium values of the  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Cys chemical shifts in the reduced form, to avoid off-resonance effects.<sup>22</sup> A prototype 2.5 mm large bandwidth detection probe with a 2  $\mu$ s, 90° pulse was employed in these experiments. The power used for saturation-transfer experiments on the  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Cys protons was 1.8 W, applied for 5–20 ms. Irradiation of the hyperfine-shifted signals corresponding to the Cu(II) species was achieved by using power levels ranging from 0.002 to 0.2 W.

**Analysis of the Hyperfine Shifts.** Interpretation of the NMR spectra of paramagnetic species depends on the evaluation of the different contributions to the observed chemical shifts,  $\delta_{\text{obs}}$ :<sup>20,49–51</sup>

$$\delta_{\text{obs}} = \delta_{\text{dia}} + \delta_{\text{con}} + \delta_{\text{pc}} \quad (1)$$

where  $\delta_{\text{dia}}$  is the chemical shift of the observed nucleus in an analogous diamagnetic system,  $\delta_{\text{con}}$  is the Fermi contact shift due to the unpaired electron density on the nucleus of interest, and  $\delta_{\text{pc}}$  represents the pseudocontact shift induced by the magnetic anisotropy of the unpaired electron(s) residing on the metal ion. In the present case,  $\delta_{\text{dia}}$  values are directly measured in the saturation-transfer experiment under the same experimental conditions in which  $\delta_{\text{obs}}$  is retrieved. In the case of rusticyanin, these values are in agreement with those previously reported.<sup>52</sup>

The pseudocontact contribution ( $\delta_{\text{pc}}$ ) can be evaluated using information derived from the protein structure and the magnetic susceptibility anisotropy tensor, or from the  $g$  tensor (whose square is proportional to the  $\chi$  tensor for  $S = 1/2$  systems with an isolated orbitally nondegenerate ground state). By assuming axial  $g$  tensors (which is a reasonably good approximation for these systems),<sup>14,17,18,29</sup>  $\delta_{\text{pc}}$  is given by<sup>49,50</sup>

$$\delta_{\text{pc}} = \frac{\mu_0 \mu_B^2 S(S+1)}{4\pi 9kT r^3} (3 \cos^2 \theta - 1)(g_{\parallel}^2 - g_{\perp}^2) \times 10^6 \quad (2)$$

where  $\mu_0$  is the magnetic permeability in a vacuum,  $\mu_B$  is the electron Bohr magneton,  $k$  is Boltzmann's constant,  $T$  is the absolute temperature,  $r$  is the proton–copper distance,  $\theta$  is the angle between the metal–proton vector and the magnetic  $z$  axis, and the  $g$  tensor parameters are defined by  $g_{\parallel} = g_{zz}$  and  $g_{\perp} = (g_{xx} + g_{yy})/2$ . Even though there is a non-negligible unpaired electron density on the sulfur atom, we have calculated the pseudocontact shift on the basis of the metal-centered approximation, which has been demonstrated to be valid for these systems.<sup>22</sup> The values used for the  $g$  components were  $g_{xx} = 2.02$ ,  $g_{yy} = 2.09$ , and  $g_{zz} = 2.20$  for pseudoazurin,<sup>53</sup> and  $g_{xx} = 2.02$ ,  $g_{yy} = 2.06$ , and  $g_{zz} = 2.21$ , for rusticyanin.<sup>39</sup> The  $g$  tensor orientation has

(35) Ambler, R. P.; Tobar, J. *Biochem. J.* **1985**, *232*, 451–457.

(36) Hall, J. F.; Kanbi, L. D.; Strange, R. W.; Hasnain, S. S. *Biochemistry* **1999**, *38*, 12675–12680.

(37) Ingledew, W. J.; Cox, J. C.; Halling, P. J. *FEMS Microbiol. Lett.* **1977**, *2*, 193–197.

(38) Djebli, A.; Proctor, P.; Blake, R. C., II; Shoham, M. *J. Mol. Biol.* **1992**, *227*, 581–582.

(39) Hall, J. F.; Hasnain, S. S.; Ingledew, W. J. *FEMS Microbiol. Lett.* **1996**, *137*, 85–89.

(40) Inoue, T.; Nishio, N.; Suzuki, S.; Kataoka, K.; Kohzuma, T.; Kai, Y. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 17845–17852.

(41) Walter, R. L.; Ealick, S. E.; Friedman, A. M.; Blake, R. C., II; Proctor, P.; Shoham, M. *J. Mol. Biol.* **1996**, *263*, 730–751.

(42) Cox, J. C.; Boxer, D. H. *Biochem. J.* **1978**, *174*, 497–502.

(43) Botuyan, M. A.; Toy-Palmer, A.; Chung, J.; Blake, R. C.; Beroza, P.; Case, D. A.; Dyson, H. J. *J. Mol. Biol.* **1996**, *263*, 752–767.

(44) Donaire, A.; Jiménez, B.; Moratal, J. M.; Hall, J. F.; Hasnain, S. S. *Biochemistry* **2001**, *40*, 837–846.

(45) Grossmann, J. G.; Ingledew, W. J.; Harvey, I.; Strange, R. W.; Hasnain, S. S. *Biochemistry* **1995**, *34*, 8406–8414.

(46) Hall, J. F.; Kanbi, L. D.; Harvey, I.; Murphy, L. M. M.; Hasnain, S. S. *Biochemistry* **1998**, *37*, 11451–11458.

(47) Kohzuma, T.; Yamada, H.; Deligeer, M.; Suzuki, S. *J. Elect. Anal. Chem.* **1997**, *438*, 49–53.

(48) Bertini, I.; Ciurli, S.; Dikiy, A.; Luchinat, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12020–12028.

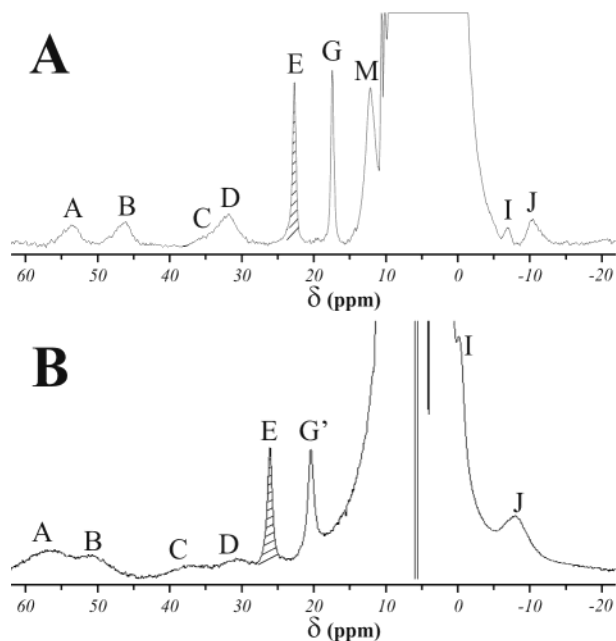
(49) McConnell, H. M.; Robertson, R. E. *J. Chem. Phys.* **1958**, *29*, 1361–1365.

(50) McConnell, H. M.; Chesnut, D. B. *J. Chem. Phys.* **1958**, *28*, 107–117.

(51) Kurland, R. J.; McGarvey, B. R. *J. Magn. Reson.* **1970**, *2*, 286–301.

(52) Hunt, A. H.; Toy-Palmer, A.; Cavanagh, J.; Blake, R. C., II; Dyson, H. J. *J. Mol. Biol.* **1994**, *244*, 370–384.

(53) Suzuki, J.; Sakurai, T.; Shidara, S.; Iwasaki, H. *Inorg. Chem.* **1989**, *28*, 802–804.



**Figure 2.**  $^1\text{H}$  NMR (800 MHz) spectra of (A) Cu(II)–pseudoazurin (100 mM Tris-HCl at pH 8.0 in  $\text{H}_2\text{O}$  at 298 K) and (B) Cu(II)–rusticyanin (100 mM acetate buffer at pH 5.5 in  $\text{H}_2\text{O}$  at 296 K). Shaded signals totally (PsAz) or partially (Rc) disappear when the spectrum is recorded in  $\text{D}_2\text{O}$  (see text).

been assumed to be similar to those found for plastocyanin<sup>54</sup> and azurin<sup>55</sup> by overlaying the copper ion and the bound N(His) atoms. Variations derived from different orientations of this tensor are expected to be within  $\pm 50\%$  of the calculated  $\delta_{\text{pc}}$  values.<sup>21–23</sup> Since  $\delta_{\text{pc}}$  is smaller than 3.2 ppm for all protons,<sup>21–23</sup> differences due to tensor orientation remain negligible in all cases.

The hyperfine coupling constants for each nucleus ( $A/h$ ) can be calculated from the following equation:<sup>49,50</sup>

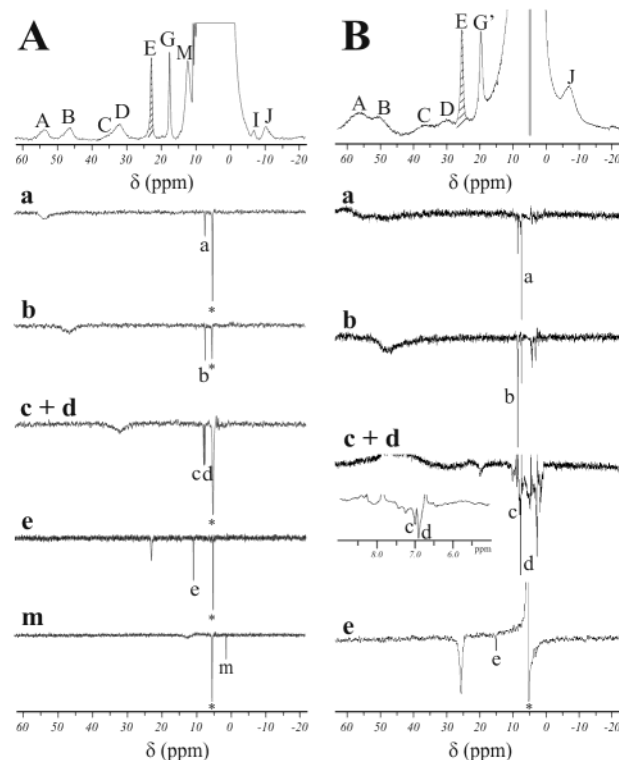
$$\frac{A}{h} = \frac{1}{2\pi} \frac{\delta_{\text{con}} 3\gamma_{\text{N}} kT}{g_{\text{av}} \mu_{\text{B}} S(S+1)} \quad (3)$$

where  $\gamma_{\text{N}}$  is the nuclear magnetogyric ratio and  $g_{\text{av}}$  is the average  $g$  value.

## Results

**Cu(II)–Pseudoazurin.** The  $^1\text{H}$  NMR spectrum of Cu(II)–pseudoazurin in  $\text{H}_2\text{O}$  at 800 MHz is shown in Figure 2A. Seven downfield-shifted (A–G, M) and two upfield-shifted signals (I, J) were detected outside the diamagnetic envelope (we have maintained the signal labeling used previously in related systems).<sup>22,23</sup> The spectrum is similar to that already reported,<sup>56</sup> with improved resolution due to the high field, that allows us to fully assign the hyperfine shifted resonances.

Signal E is absent when the spectrum is recorded in  $\text{D}_2\text{O}$  solution. Resonances A–M were assigned through saturation-transfer experiments performed on a sample of oxidized pseudoazurin containing ca. 5% of the reduced species. Irradiation of resonances A–D gave saturation transfer with signals at 7.0, 6.8, 7.5, and 7.2 ppm, respectively (Figure 3A). From the observed diamagnetic shifts of these resonances, we conclude



**Figure 3.**  $^1\text{H}$  NMR (800 MHz) saturation-transfer spectra of (A) Cu(II)–pseudoazurin and (B) Cu(II)–rusticyanin. The irradiated signals are indicated in each trace with lowercase letters. The upper trace represents the reference spectrum. The signal marked with an asterisk corresponds to the  $\text{H}_2\text{O}$  resonance. Conditions are the same as in Figure 2. The inset in Figure 3B (c + d) shows the expanded 5–9 ppm region.

**Table 1.** Hyperfine-Shifted Signals Corresponding to Copper Ligands in Cu(II)– and Cu(I)–Pseudoazurin Recorded at 800 MHz in 100 mM Tris-HCl at pH 8.0 and 298 K

signal	assignments	$\delta(\text{ppm})_{\text{ox}}$	$\delta(\text{ppm})_{\text{red}}$
	H $\beta$ Cys78	$510 \pm 70$	2.8
	H $\beta'$ Cys78	$390 \pm 50$	3.1
A	H $\delta 2$ His81	53.5	7.0
B	H $\delta 2$ His40	46.1	6.8
C	He1 His40	32.0	7.5
D	He1 His81	32.0	7.2
E	He2 His40	23.0	10.5
G	H $\alpha$ Asn41	17.4	4.9
M	$\epsilon$ -CH <sub>3</sub> Met86	12.1	0.8
	NH Asn41	$-15.0 \pm 4.0$	9.6

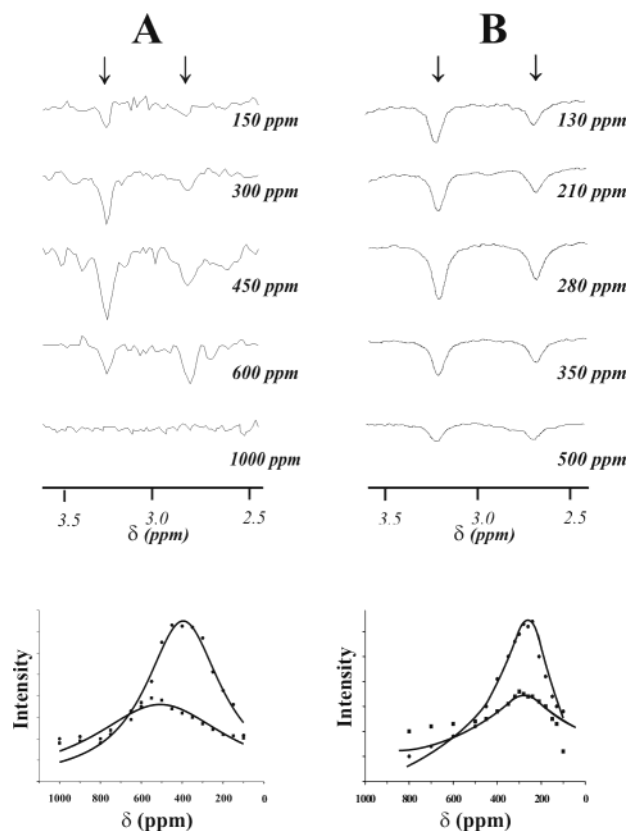
that signals A–D correspond to the nonexchangeable H $\delta 2$  and He1 protons of His40 and His81 (Table 1). Irradiation of the only exchangeable hyperfine-shifted signal (E) yielded a saturation transfer with a resonance at 10.5 ppm, which we assign to the exchangeable He2 proton of the most buried histidine ligand, His40. No resonance corresponding to the He2 imidazole proton of the exposed His81 is observed, in agreement with the spectroscopic data on amicyanin, azurin, and plastocyanin.<sup>21–24</sup> The assignments of the imidazole His resonances concur with those previously reported in these proteins.

Signal G displayed a saturation transfer with a resonance located at 4.9 ppm (not shown). The chemical shifts of this nucleus in both oxidation states are coincident with similar signals attributed to the H $\alpha$  of an Asn residue next to one of the His ligands (Asn41 in this protein).<sup>22,23</sup> Signal M showed a saturation transfer with a signal located at 0.8 ppm (Figure 3). Both the intensity of this signal and the chemical shift of the

(54) Penfield, K. W.; Gewirth, A. A.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4519–4529.

(55) Coremans, J. W. A.; Poluektov, O. G.; Groenen, E. J. J.; Canters, G. W.; Nar, H.; Messerschmidt, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3097–3101.

(56) Sato, K.; Dennison, C. *Biochemistry* **2002**, *41*, 120–130.



**Figure 4.** Reconstructed  $^1\text{H}$  NMR (800 MHz) spectrum containing signals not observable in the normal spectrum. The positions and line widths of these signals were obtained by plotting the intensity of the respective exchange connections with the reduced species ( $\bullet$ ,  $\blacksquare$ ) as a function of the decoupler irradiation frequency, and by fitting these values to a Lorentzian function (indicated as a continuous line in the plot):  $\beta$ - $\text{CH}_2$  Cys signals in (A) Cu(II)–pseudoazurin and (B) Cu(II)–rusticyanin.

reduced counterpart suggest that it corresponds to a methyl group. The only candidate for this signal, therefore, is the  $\epsilon$ - $\text{CH}_3$  from Met86. The positions of all diamagnetic signals in the reduced protein detected through saturation-transfer experiments are similar to those found in *Paracoccus pantotrophus* Cu(I)–pseudoazurin,<sup>57</sup> confirming the present assignments.

To locate the fast-relaxing resonances, a blind saturation-transfer experiment was performed.<sup>22</sup> A very large spectral window was sampled in steps of 50–100 ppm. Observation of the build-up and decay of the signal intensity as a function of the sampled frequency provided the precise location of these extremely broad signals (Figure 4A). Two downfield resonances were located at  $510 \pm 70$  and  $390 \pm 50$  ppm, according to the profiles shown in Figure 4A, that we assign as the  $\beta$ - $\text{CH}_2$  protons of Cys78 on the basis of their large chemical shifts and line widths.<sup>22,23</sup> When the upfield region was irradiated, a saturation transfer was observed with a signal at 9.6 ppm, the maximum intensity of which corresponded to irradiation at  $-15$  ppm (not shown). By analogy with  $^1\text{H}$  NMR studies on related proteins, we attribute this resonance to the peptide NH of Asn41.<sup>22,23</sup>

**Cu(II)–Rusticyanin.** The  $^1\text{H}$  NMR spectrum of rusticyanin recorded in  $\text{H}_2\text{O}$  at 800 MHz is shown in Figure 2B. Six downfield signals (A–E, G') can be located outside the diamagnetic envelope, whereas two resonances (I, J) are found

**Table 2.** Hyperfine-Shifted Signals Corresponding to Copper Ligands in Cu(II)– and Cu(I)–Rusticyanin Recorded at 800 MHz in 100 mM Acetate Buffer at pH 5.5 and 296 K

signal	assignments	$\delta(\text{ppm})_{\text{ox}}$	$\delta(\text{ppm})_{\text{red}}$
	H $\beta$ Cys	$240 \pm 20$	3.2
	H $\beta'$ Cys	$300 \pm 50$	2.7
A	H $\delta 2$ His143	58.1	6.7
B	H $\delta 2$ His85	50.2	7.9
C	He1 His85	36.7	7.1
D	He1 His143	30.3	7.0
E	He2 His85	25.3	14.5
G'	H $\alpha$ Ser86	19.5	5.0
M	$\epsilon$ - $\text{CH}_3$ Met148	8.1	0.8
	NH Ser86	$-20.0 \pm 4.0$	10.6

in the upfield portion of the spectrum. Signal E exhibits a fractional intensity when the spectrum is recorded in  $\text{D}_2\text{O}$ . A detailed analysis of the superWEFT spectrum in the diamagnetic envelope reveals a fast-relaxing broad signal (M) at 8.1 ppm (not shown). The intensity of this signal is not altered when the spectrum is recorded in  $\text{D}_2\text{O}$ .

The paramagnetically shifted signals were assigned on the basis of 1D exchange spectroscopy on a partially (3%) reduced sample (Figure 3B). Irradiation of signals A and B gave saturation transfer with signals at 6.7 and 7.9 ppm, corresponding to the chemical shifts of the H $\delta 2$  protons of His143 and His85 in the reduced species,<sup>52</sup> respectively (Table 2). Irradiation of signals C and D gave saturation transfer with signals at 7.1 and 7.0 ppm, assigned to the He1 protons of the histidine ligands. An irradiation profile performed in steps of 3 ppm in this region (40–20 ppm) allowed us to unequivocally assign signals C and D as the He1 protons of His85 and His143, respectively (data not shown). When signal E was irradiated, a saturation transfer was observed at 14.5 ppm (Figure 3B), indicating that this signal corresponds to the He2 proton of His85. Signals G', I, and J gave saturation transfer with signals at 5.0, 2.6, and 5.1 ppm that correspond to the chemical shifts of the H $\alpha$  of Ser86, H $\beta 1$  of His143, and H $\alpha$  of Cys138, respectively.<sup>52</sup> These assignments are coincident with those from Cu(II)–PsAz (see above) and are analogous to those previously reported for other Cu(II) BCPs.<sup>21–23</sup> As mentioned above, a fast-relaxing signal at 8.1 ppm can be detected. This signal is absent in the superWEFT spectrum of several Cu(II)Rc mutants in which the axial methionine has been replaced by another amino acid (A. Donaire, unpublished). Hence, we tentatively assign this signal as the  $\epsilon$ - $\text{CH}_3$  from Met148.

Blind saturation-transfer experiments were performed to locate the  $\beta$ - $\text{CH}_2$  Cys signals. The profile of the irradiation response for these resonances is shown in Figure 4B. Fitting of these profiles to Lorentzian functions yields maxima at  $300 \pm 50$  and  $240 \pm 20$  ppm. Blind NOE experiments, irradiating close to  $-20$  ppm, gave a response at 10.6 ppm (not shown). This chemical shift corresponds to the amide NH of Ser86 in the reduced form.<sup>52</sup> This saturation transfer was observed in experiments performed in  $\text{D}_2\text{O}$ , indicating that this proton is not easily exchangeable with bulk solvent. This finding supports this assignment, since the Ser86 NH amide proton is hydrogen-bonded to the  $\text{S}_\gamma(\text{Cys})$  atom in rusticyanin.<sup>41,43</sup>

## Discussion

**Analysis of the NMR Spectra.** The  $^1\text{H}$  NMR spectra of Cu(II)–PsAz and Cu(II)–Rc resemble those reported for other

(57) Thompson, G. S.; Leung, Y. C.; Ferguson, S. J.; Radford, S. E.; Redfield, C. *Protein Sci.* **2000**, *9*, 846–858.

**Table 3.** Diamagnetic, Pseudocontact, and Contact Contribution to the Chemical Shifts (in ppm) of Protons Belonging to Coordinated Residues for Oxidized PsAz and Rc, as Well as Contact Contributions of the Analogous Protons for Oxidized Pc, Az, St, and Am and the Average Values for  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Cys Observed Shifts,  $\delta_{1/2}$ 

proton	PsAz, 298 K, pH 8 (this work)				Rc, 296 K, pH 5.5 (this work)				Pc, <sup>a</sup> 298 K, pH 7.5	Az, <sup>b</sup> 278 K, pH 8.0	St, <sup>b</sup> 301 K, pH 6.0	Am, <sup>c</sup> 308 K, pH 7.0
	$\delta_{\text{obs}}$	$\delta_{\text{dia}}$	$\delta_{\text{pc}}$	$\delta_{\text{con}}$	$\delta_{\text{obs}}$	$\delta_{\text{dia}}$	$\delta_{\text{pc}}$	$\delta_{\text{con}}$	$\delta_{\text{con}}$	$\delta_{\text{con}}$	$\delta_{\text{con}}$	$\delta_{\text{con}}$
Cys H $\beta$ 1	510	2.8	−0.9	508	300	2.7	0.8	297	650	850	450	
H $\beta$ 2	390	3.1	0.5	386	240	3.2	0.8	236	490	800	370	
$\delta_{1/2}$	450				270				570	825	410	
H $\alpha$	<i>e</i>				−8.9	5.1	−0.7	−13.3	−12.3	−11.5	−11.4	−12.9 <sup>g</sup>
HisN H $\delta$ 2	46.1	6.8	−0.7	40.0	50.2	7.9	−0.8	43.1	40.5	44.5	42.2 <sup>d</sup>	36.6
He1	32.0	7.5	−3.1	27.6	36.7	7.1	−3.5	33.1	31.9	44.4 <sup>d</sup>	39.0 <sup>d</sup>	
HN $\epsilon$ 2	23.0	10.5	−0.8	13.3	25.3	14.5	−0.9	11.7	20.7	16.7	17.0	14.9
HisC H $\delta$ 2	53.5	7.0	−0.8	47.3	58.1	6.7	−0.9	52.3	45.5	48.2	49.0 <sup>d</sup>	43.5
He1	32.0	7.2	1.3	23.5	30.3	7.0	1.6	21.7	28.2	30.6 <sup>d</sup>	27.8 <sup>d</sup>	
Met $\epsilon$ -CH <sub>3</sub>	12.1	0.8	0.8	10.5	8.1	0.8	1.3	6.0	<i>e</i>	<i>e</i>	<i>e</i>	<i>e</i>
H $\gamma$ 1	<i>e</i>				<i>e</i>				8.6			6.7 <sup>f</sup>
H $\gamma$ 2	<i>e</i>				<i>e</i>				19.9			7.3 <sup>f</sup>
Asn/Ser												
HN	−15.0	9.6	−1.2	−23.4	−20.0	10.6	−1.7	−28.9	−28.4	−39.0	−22.0	
H $\alpha$	17.4	4.9	−0.4	12.7	19.5	5.0	−0.4	14.9	13.1	15.5	13.0	9.4 <sup>g</sup>

<sup>a</sup> Pc (plastocyanin), from ref 22. <sup>b</sup> Az (azurin) and St (stellacyanin), from ref 23. <sup>c</sup> Am (Amicyanin), from ref 21. <sup>d</sup> Sequence-specific assignment for these protons is tentatively proposed in this work (see text). <sup>e</sup> Not observed. <sup>f</sup> Assignments may be exchanged. <sup>g</sup> Calculated in this work, from the  $\delta_{\text{obs}}$  values reported in ref 21.

**Table 4.** Hyperfine Coupling Constants in BCPs

proton	<i>A/h</i> (MHz)					
	PsAz (this work)	Rc (this work)	Pc <sup>a</sup>	Az <sup>b</sup>	St <sup>b</sup>	Am <sup>c</sup>
Cys H $\beta$	18	11	23	28/27	16/13	
H $\beta'$	14	8	17	27/28	13/16	
H $\alpha$		−0.47	−0.44	−0.38	−0.41	−0.46 <sup>d</sup>
HisN H $\delta$ 2	1.43	1.55	1.45	1.49	1.53	1.31
He1	0.99	1.19	1.14	1.48	1.40	
He2	0.48	0.42	0.74	0.56	0.62	
HisC H $\delta$ 2	1.69	1.87	1.63	1.61	1.77	1.56
He1	0.85	0.77	1.01	1.02	1.01	
Met $\epsilon$ -CH <sub>3</sub>	0.37	0.22				
Asn/Ser HN	−0.78	−1.06	−1.02	−1.3	−0.8	
H $\alpha$	0.45	0.54	0.47	0.52	0.47	0.34 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> From ref 22. <sup>b</sup> From ref 23. <sup>c</sup> From ref 21. <sup>d</sup> Calculated in this work, from the  $\delta_{\text{obs}}$  values reported in ref 21.

oxidized BCPs (amicyanin, plastocyanin, azurin, and stellacyanin).<sup>21–23</sup> The histidine signals display similar spectral features in all studied cupredoxins, whereas those resonances corresponding to the cysteine and axial ligand(s) vary among different proteins, reflecting changes in the electronic structure of the metal site. It has been shown that, in classic and tetrahedrally distorted blue sites, the Cu(II)–Cys interaction depends on the axial ligand(s):<sup>23</sup> a stronger axial ligand (such as in stellacyanin) reduces the Cu(II)–S $\gamma$ (Cys) covalence,<sup>12</sup> thus giving rise to a much smaller electron spin density on the  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Cys protons. Along this line, we would like to analyze how the tetragonal distortion in PsAz and Rc affects the unpaired spin density in the different copper ligands.

The electron spin density on the copper ligand nuclei was calculated as described in the Materials and Methods section. Table 3 displays the calculated pseudocontact ( $\delta_{\text{pc}}$ ) and contact ( $\delta_{\text{con}}$ ) shifts for pseudoazurin and rusticyanin, compared to those from other BCPs. Table 4 summarizes the hyperfine coupling constants (*A/h*) for the protons of the coordinated residues obtained by applying eq 3. In the following sections, we will discuss these parameters in comparison to those from other oxidized BCPs studied by NMR spectroscopy (amicyanin,<sup>21</sup> plastocyanin,<sup>22</sup> azurin, and stellacyanin<sup>23</sup>).

**(a) His Signals.** Comparison of the NMR features of the imidazole His signals in different BCPs reveal that their  $\delta_{\text{con}}$  values are H $\delta$ 2 (HisC) > H $\delta$ 2 (HisN) > He1 (HisN) > He1 (HisC) > He2 (HisN) (Table 3). For the three observable histidine protons in all BCPs, the contact shifts follow the trend H $\delta$ 2 > He1 > He2, which holds for both His ligands. On the basis of these observations, we suggest a sequence-specific assignment for the His resonances in azurin and stellacyanin,<sup>23</sup> as indicated in Table 3. In the case of azurin, these assignments are supported by ENDOR/ESEEM data.<sup>58</sup>

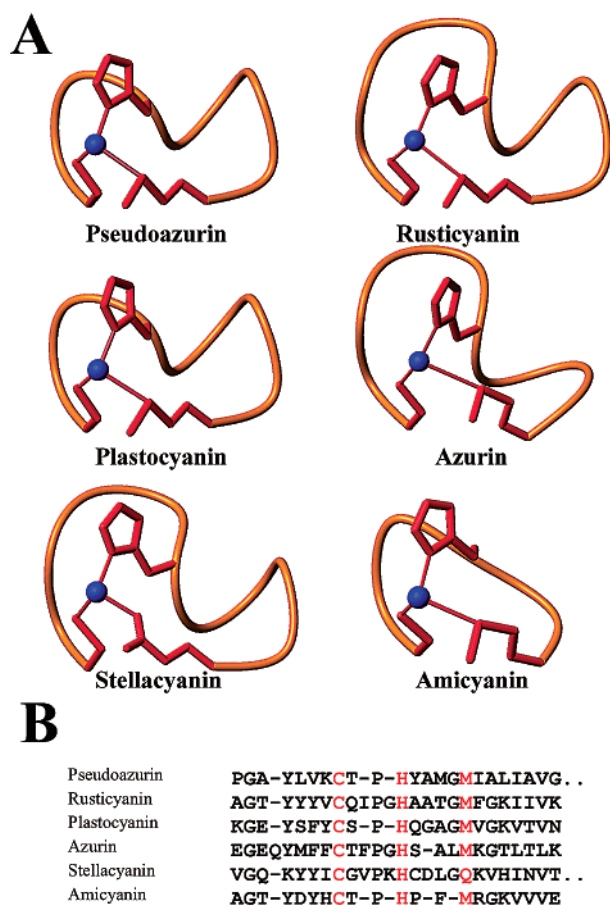
The  $\delta_{\text{con}}$  values for each type of proton (except the He1 signals of azurin) span rather narrow shift ranges, for both HisN and HisC resonances. These observations indicate that (1) the unpaired spin density in both histidine ligands is fairly constant in the different blue copper proteins, in both classic and distorted sites, and (2) the same electron delocalization pattern is operative in both histidine ligands. These conclusions are feasible, provided the orientation of the copper orbitals in the *xy* plane with respect to the histidine ligands is similar in all blue sites. Van Gestel et al. recently pointed out that the magnetic *z* axis in different BCPs is nearly perpendicular to the plane defined by the copper ion and the coordinated N $\delta$ 1(His).<sup>13</sup> Our results provide further support for this proposal.

The environments of HisN and HisC are different in different BCPs. HisC is solvent-exposed, being located in the middle of a loop connecting two  $\beta$ -strands,<sup>59</sup> distinguished by different lengths and conformations in each blue copper protein (Figure 5). HisN is invariably buried in the protein structure. The relatively small variation in chemical shifts observed for the imidazole protons of both of the His ligands among the BCPs suggests that their orientation is conserved in BCPs. This is not unexpected for HisN, but it indicates that HisC is sufficiently flexible to accommodate its conformation in such a way as to give rise to a similar copper–N $\delta$ 1 interaction in all BCPs (Figure 5).<sup>60–63</sup>

(58) van Gestel, M.; Coremans, J. W. A.; Jeuken, L.; Canters, G. W.; Groenen, E. J. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 4462–4470.

(59) Buning, C.; Canters, G. W.; Comba, P.; Dennison, C.; Jeuken, L.; Melter, M.; Sanders-Loehr, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 204–211.

(60) Baker, E. N. *J. Mol. Biol.* **1988**, *203*, 1071.



**Figure 5.** (A) Schematic representation of the C-terminal loop containing the Cys, HisC, and Met ligands for *Achromobacter cycloclastes* pseudoazurin,<sup>40</sup> *Thiobacillus ferrooxidans* rusticyanin,<sup>41</sup> *Populus nigra* plastocyanin,<sup>80</sup> *Alcaligenes xylooxidans* azurin,<sup>63</sup> cucumber (*Cucumis sativus*) stellacyanin,<sup>81</sup> and *Paracoccus denitrificans* amicyanin.<sup>82</sup> (B) Sequence alignment of the same blue copper proteins. Copper ligands are colored in red. The structures (PDB files) are the same as in Table 5.

**(b) Cys Signals.** The most outstanding difference among <sup>1</sup>H NMR spectra of different BCPs concerns the β-CH<sub>2</sub> Cys proton chemical shifts, which range from 850 to 240 ppm (Table 3). We have located and assigned these resonances in Cu(II)–pseudoazurin (at 510 and 390 ppm) and Cu(II)–rusticyanin (at 300 and 240 ppm). In both cases, the chemical shifts are smaller than those of the analogous signals in plastocyanin, which possesses a classic blue site with the same ligand set (CysHis<sub>2</sub>Met).

The β-Cys proton chemical shifts are dominated by the contact contribution directly related to the unpaired spin density on the S<sub>γ</sub>(Cys) atom. The shift of each β<sub>i</sub>-Cys proton depends on the Cu–S<sub>γ</sub>–C<sub>β</sub>–H<sub>βi</sub> dihedral angle through a Karplus-like equation<sup>64</sup> that may follow a cosine-squared or sine-squared dependence, depending on whether the mechanism of delocalization onto the Cys residue is mediated by π- or σ-type orbitals.<sup>65</sup> For Pc, where the stereospecific assignment of both

β-CH<sub>2</sub> Cys protons was performed, a sine-squared dependence was proposed, suggesting a dominant π delocalization.<sup>22</sup> This is consistent with the orientation of the *xy* magnetic axes in Pc that give rise to a π-type overlap between the Cu(II) d<sub>x<sup>2</sup>-y<sup>2</sup></sub> and sulfur orbitals.<sup>12</sup> However, the tetragonal distortion induces a rotation of the d<sub>x<sup>2</sup>-y<sup>2</sup></sub> orbital,<sup>4</sup> which is expected to give rise to a mixed π and σ delocalization mechanism that cannot be accurately discerned.

The average chemical shift of the β-CH<sub>2</sub> Cys protons (δ<sub>1/2</sub>), however, is almost independent of the Cys conformation and may be used as a reliable estimate of the electron spin density on the S<sub>γ</sub>(Cys) atom.<sup>31</sup> The β-CH<sub>2</sub> Cys δ<sub>1/2</sub> values (averaged from the observed shifts) are ranked in the following order: Cu(II)–azurin (825 ppm) > Cu(II)–plastocyanin (570 ppm) > Cu(II)–pseudoazurin (450 ppm) > Cu(II)–stellacyanin (415 ppm) > Cu(II)–rusticyanin (270 ppm). This indicates that the electron spin density in the S<sub>γ</sub>(Cys) atom in pseudoazurin and rusticyanin is reduced by ~20% and 55%, respectively, compared to that in plastocyanin. Hence, the Cu(II)–S<sub>γ</sub>(Cys) covalence is decreased in tetragonally perturbed copper centers, in agreement with X-ray absorption data in the cucumber basic protein.<sup>12</sup> Interestingly, there are remarkable changes in the Cu(II)–Cys interaction in these two closely related copper sites. The X-ray structures of PsAz and Rc reveal that the Cu–S<sub>γ</sub>(Cys) distance in Rc is 0.13 Å longer than that in PsAz (Table 5). Indeed, Rc displays the longest Cu(II)–S<sub>γ</sub>(Cys) bond among native BCPs. It is reasonable to assume that the longer the Cu–S<sub>γ</sub>(Cys) bond length, the smaller the electron spin density on the S<sub>γ</sub> atom. If this is the only geometrical factor influencing the electron delocalization, a linear relationship should be observed when plotting 1/δ<sub>1/2</sub> vs r<sub>CuS</sub> (Figure 6A). This trend holds if azurin is excluded: the Cu–S<sub>γ</sub>(Cys) distances in azurin and pseudoazurin are similar within experimental error (Table 5), but δ<sub>1/2</sub> in azurin almost doubles the value found for pseudoazurin (Table 3). Hence, this correlation cannot quantitatively account for the measured shifts of all BCPs, and other factors should be considered.

All spectroscopic and theoretical descriptions of the electronic structure of blue copper sites indicate that the unpaired electron in the oxidized state is confined to the d<sub>x<sup>2</sup>-y<sup>2</sup></sub> orbital (orbital mixing in perturbed copper centers amounts to a d<sub>z<sup>2</sup></sub> orbital contribution < 1.5% of the HOMO wave function).<sup>12</sup> Therefore, at a fixed Cu–S<sub>γ</sub>(Cys) distance, the copper–sulfur overlap will depend on the displacement of the sulfur atom from the *xy* plane. As we have already pointed out, the magnetic *xy* copper axes are defined by the CuN<sub>His</sub>N<sub>His</sub> plane. Hence, the largest copper–sulfur orbital overlap (either through a π or σ mechanism) will occur when the Cu–S<sub>γ</sub>(Cys) bond lies in the CuN<sub>His</sub>N<sub>His</sub> plane, i.e., when the angle (α) between the CuN<sub>His</sub>N<sub>His</sub> plane and the Cu–S<sub>γ</sub>(Cys) bond is 0°. Instead, at α = 90°, no direct electron delocalization should be expected. The values of this angle in different BCPs are tabulated in Table 5. The copper ion in azurin is almost coplanar to the *xy* axes, while in other BCPs the copper is displaced out of this plane toward the axial ligand (Table 5). This explains the unusually large β-CH<sub>2</sub> Cys chemical shifts observed in azurin.<sup>23</sup> On the basis of these observations, the angular dependence could be accounted for by the following equation:

$$\delta_{1/2} = \frac{A}{r + B \tan \alpha + C} \quad (4)$$

(61) Nar, H.; Messerschmidt, A.; Huber, R.; van de Kamp, M.; Canters, G. W. *J. Mol. Biol.* **1991**, *221*, 765–772.

(62) Murphy, L. M. M.; Strange, R. W.; Karlsson, G. B.; Lundberg, L. G.; Pascher, T.; Reinhammar, B.; Hasnain, S. S. *Biochemistry* **1993**, *32*, 1965–1975.

(63) Dodd, F. E.; Abraham, Z. H.; Eady, R. R.; Hasnain, S. S. *Acta Crystallogr. D* **2000**, *56*, 690–696.

(64) Karplus, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870–2871.

(65) Bertini, I.; Capozzi, F.; Luchinat, C.; Piccioli, M.; Vila, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 651–660.

**Table 5.** Structural Parameters of Different Blue Copper Sites

protein	copper distance (Å) to				Cu out of plane (Å)	$\phi$ (deg) <sup>a</sup>	$\alpha$ (deg) <sup>b</sup>	PDB code <sup>c</sup>
	HisN N $\delta$ 1	HisC N $\delta$ 1	Cys S $\gamma$	axial L				
PsAz <sup>d</sup>	1.95	1.92	2.13	2.71 (S $\delta$ M86)	0.36	75.5	26.0	1bqk
Rc <sup>e</sup>	2.04	1.89	2.26	2.89 (S $\delta$ M148)	0.32	77.1	24.2	1rcy
Pc <sup>f</sup>	1.91	2.06	2.07	2.82 (S $\delta$ M92)	0.36	81.6	26.1	1plc
Az <sup>g</sup>	2.04	1.99	2.14	3.26 (S $\delta$ M121)	0.01	82.3	−0.4	1dyz
				2.72 (O G45)				
St <sup>h</sup>	1.96	2.04	2.18	2.21 (O $\epsilon$ Q99)	0.32	83.5	22.9	1jer
Am <sup>i</sup>	1.95	2.03	2.11	2.91 (S $\delta$ M98)	0.30	79.4	22.3	1aac

<sup>a</sup>  $\phi$  is the angle between the N<sub>His</sub>CuN<sub>His</sub> and S<sub>Cys</sub>CuS<sub>Met</sub> planes. <sup>b</sup>  $\alpha$  is the angle formed by the CuN<sub>His</sub>N<sub>His</sub> plane and the Cu–S $\gamma$ (Cys) vector (see eq 4). <sup>c</sup> The PDB files used correspond to the structures with the best resolution for the corresponding oxidized BCP that exist to date in the Protein Data Bank. <sup>d</sup> *Achromobacter cycloclastes* pseudoazurin at 1.35 Å.<sup>40</sup> <sup>e</sup> *Thiobacillus ferrooxidans* rusticyanin at 1.90 Å.<sup>41</sup> <sup>f</sup> *Populus nigra* plastocyanin at 1.33 Å.<sup>80</sup> <sup>g</sup> *Alcaligenes xylosoxidans* azurin at 1.75 Å.<sup>63</sup> <sup>h</sup> Cucumber (*Cucumis sativus*) stellacyanin at 1.60 Å.<sup>81</sup> <sup>i</sup> *Paracoccus denitrificans* amicyanin at 1.31 Å.<sup>82</sup>

where  $r$  is the Cu–S $\gamma$ (Cys) distance,  $\alpha$  is the angle formed between the CuN<sub>His</sub>N<sub>His</sub> plane and the Cu–S $\gamma$ (Cys) vector, and  $A$ ,  $B$ , and  $C$  are parameters to be determined. For Cu(II)–Az,  $\text{tg } \alpha = 0$  (which eliminates the angular dependence and allows us to correlate  $A$  and  $C$  by a simple mathematical relationship). Fitting the experimental data from the proteins in Table 5 to eq 4 yielded the following parameters:  $A = 100 \text{ ppm} \cdot \text{Å}$ ,  $B = 0.28 \text{ Å}$ , and  $C = -2.02 \text{ Å}$ . The experimental  $\delta_{1/2}$  and the values calculated from eq 4 show a satisfactory agreement, as shown in Figure 6B. This indicates that, notwithstanding the heuristic character of eq 4,  $\delta_{1/2}$  correlates with two structural factors that affect the copper–sulfur overlap, the Cu–S bond length and the deviation of this bond from the  $xy$  copper axis, confirming that this parameter provides an estimate of the electron spin density on the Cys sulfur atom.

The displacement of the copper ion from the N<sub>His</sub>N<sub>His</sub>S<sub>Cys</sub> plane was initially suggested to be an indicator of a perturbed blue copper center.<sup>66</sup> However, plastocyanin and amicyanin present classic type 1 centers, notwithstanding the copper ion is 0.30–0.36 Å out from this plane (Table 5). Later, spectroscopic and theoretical approaches correlated the degree of tetragonal distortion to the angle subtended by the N<sub>His</sub>CuN<sub>His</sub> and S<sub>Cys</sub>CuS<sub>Met</sub> planes ( $\phi$ ).<sup>12,67</sup> These studies revealed that the intensity ratio of the two LMCT bands at 450 and 600 nm in BCPs depends on the ratio of  $\sigma$  and  $\pi$  Cu(II)–S overlap, i.e., on the orientation of the Cu–S vector projection in the N<sub>His</sub>CuN<sub>His</sub> plane. Here we have found that the electron spin density on the S $\gamma$ (Cys), instead, depends on the tilting of the Cu–S bond with respect to the same plane (angle  $\alpha$ ). This clearly indicates that the degree of tetragonal distortion is not necessarily related to the strength of the Cu(II)–S $\gamma$ (Cys) bond.

**(c) Asn41/Ser86 Signals.** In most BCPs, the amide NH proton of an Asn residue following ligand HisN forms a hydrogen bond with the S $\gamma$ (Cys) atom.<sup>22–24,32</sup> Rusticyanin is an exception, since the Asn residue is replaced by a Ser.<sup>41,43</sup> This allows us to directly compare the hydrogen bond features of two metal sites with similar coordination geometries.

Signal G and the resonance located at −15 ppm in the <sup>1</sup>H NMR spectrum of Cu(II)–pseudoazurin (Figure 2A) were assigned to the H $\alpha$  and peptide NH protons of Asn41, respectively (Table 1). The observed shifts are mostly due to a

contact contribution (Table 3), reflecting a net spin density onto this residue, that can be tracked to the conserved S $\gamma$ (Cys)–NH(Asn) hydrogen bond. With the exception of rusticyanin (−28.9 ppm), the contact chemical shift of this NH proton does not reflect faithfully the trend observed for the  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Cys  $\delta_{1/2}$  values: Cu(II)–azurin (−39 ppm) < Cu(II)–plastocyanin (−28.4 ppm) < Cu(II)–pseudoazurin (−23.4 ppm) < Cu(II)–stellacyanin (−22 ppm). Instead, the position of the H $\alpha$  signal is mostly insensitive to the electron spin density on the Cys residue.<sup>21–24</sup>

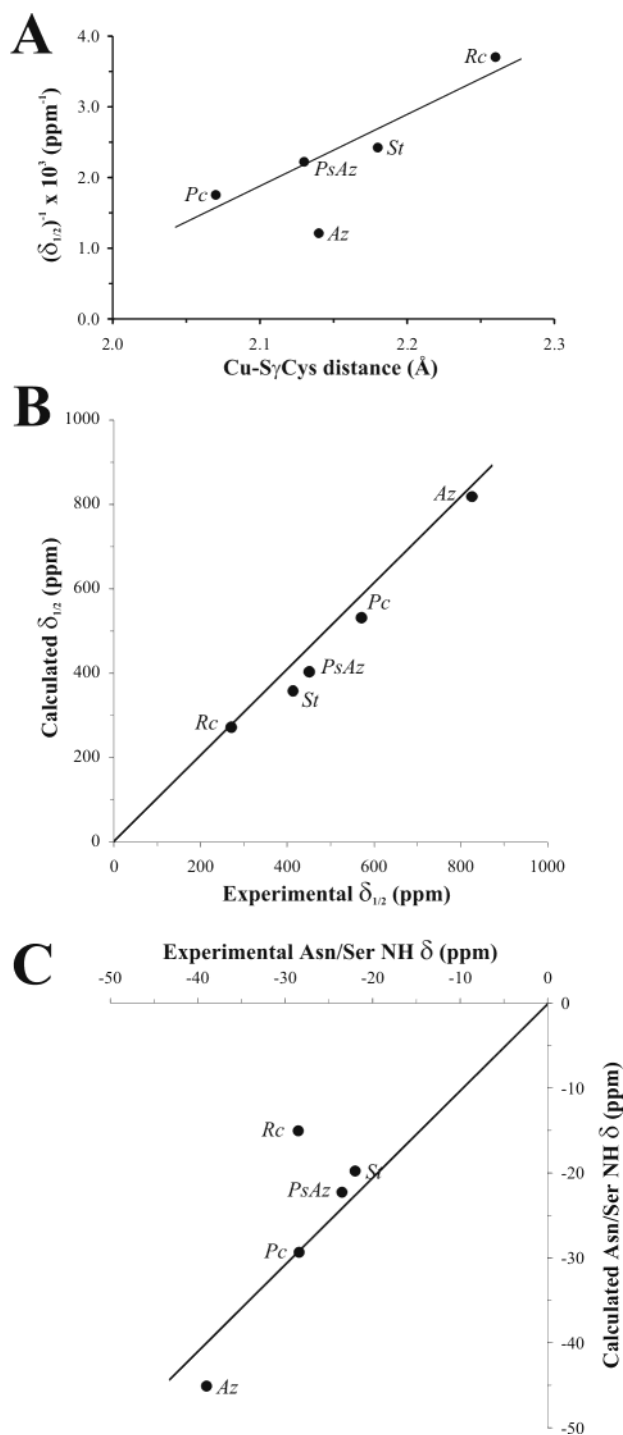
We attempted to account for the contact shift of the Asn NH resonance by using eq 4 with the geometric parameters  $A$  and  $C$  and fitting the proportionality constant  $A$ . This yields a value of  $A(\text{NH}) = -5.0 \text{ ppm} \cdot \text{Å}$ . The correlation found for this NH proton is shown in Figure 6C. If we exclude rusticyanin from this plot, a linear correlation ( $R^2 = 0.912$ ) is observed. This is an independent set of data that supports the suitability of the correlation proposed by eq 4. Hence, for BCPs containing an Asn next in sequence to HisN, the differences in the unpaired spin delocalization onto the NH of this residue depend exclusively on the electron spin density on the S $\gamma$ (Cys).

The rusticyanin Ser86 NH proton does not follow this correlation (Figure 6C). A higher unpaired spin density is observed in this NH proton compared to that expected according to eq 4. Hence, the substitution of an Asn by a Ser in this position alters the unpaired electron density distribution in the second coordination sphere of the copper ion.

**(d) Met Signals.** Resonance M, located at 12.1 ppm, has been assigned to the  $\epsilon$ -CH<sub>3</sub> methyl group of Met86 in Cu(II)–pseudoazurin on the basis of the signal intensity and the chemical shift in the reduced form (Table 1). The estimated pseudocontact contribution for this signal is 0.8 ppm, thus revealing the existence of net electron spin density in the Met methyl group, in contrast with Cu(II)–plastocyanin. This may be, in principle, attributed to the shorter Cu(II)–S $\delta$ (Met) bond in pseudoazurin (2.71 Å) compared to that in plastocyanin (2.82 Å). No Met proton resonances could be located in the <sup>1</sup>H NMR spectrum of Cu(II)–rusticyanin outside the diamagnetic envelope. Spectra recorded in such a way to optimize detection of fast-relaxing resonances allowed us to identify an intense signal at 8.1 ppm that could correspond to the  $\epsilon$ -CH<sub>3</sub> Met moiety. By following the reasoning applied for the analogous resonance in pseudoazurin, the hyperfine shift in Rc might be attributed mostly to a contact contribution (Table 3) that is smaller than the  $\delta_{\text{con}}$  calculated for pseudoazurin (6.0 versus 10.5 ppm, Table 3). Again, the smaller contact contribution can be attributed to

(66) Lu, Y.; LaCroix, L. B.; Lowery, M. D.; Solomon, E. I.; Bender, C. J.; Peisach, J.; Roe, J. A.; Gralla, E. B.; Valentine, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5907–5918.

(67) Pierloot, K.; De Kerpel, J. A. O.; Ryde, U.; Olsson, M. H.; Roos, B. O. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13156–13166.



**Figure 6.** (A) Plot of the reciprocal  $\delta_{1/2}$  (see text) for the  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Cys protons as a function of the Cu-S<sub>γ</sub>(Cys) distance. Errors in  $r(\text{Cu}-\text{S})$  distances are  $< 0.04$  Å. (B) Plot of the inverse of the calculated  $\delta_{1/2}$  for  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Cys versus the observed values according to eq 4. (C) Plot of the reciprocal calculated contact chemical shifts for the Asn/Ser86 NH versus the experimental values according to eq 4. Parameters A, B, and C are given in the text.

the longer Cu(II)-S<sub>δ</sub>(Met) distance in rusticyanin than that in pseudoazurin (Table 5).

The  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> Met resonances have been identified in the spectra of Cu(II)-plastocyanin (at 23.5 and 13.0 ppm)<sup>22</sup> and Cu(II)-amicyanin (11.1 and 12 ppm)<sup>21</sup> and are absent in the spectra of Cu(II)-pseudoazurin and Cu(II)-rusticyanin. These differences can be attributed to the observation that the Met side chain

adopts a trans conformation in classic blue sites and a gauche conformation in tetragonally distorted sites.<sup>68</sup> These distinct conformations clearly lead to different electron delocalization patterns in the axial Met. Hence, even if NMR data are limited for this residue, they are indicative of the Met side chain conformation.

**Electronic Structure and Molecular Frame.** This NMR study reveals common features of the electronic structure of Cu(II)-pseudoazurin and Cu(II)-rusticyanin. The electron spin density on the Cys ligand is reduced, while the electron delocalization pattern of the axial (Met) ligand is different when compared to that of Pc, reflecting the different orientation of the Met residue. The decrease of the  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Cys  $\delta_{1/2}$  in pseudoazurin (with a Cu(II)-S<sub>δ</sub>(Met) distance of 2.71 Å) with respect to plastocyanin is almost as large as that induced in stellacyanin by the presence of an axial Gln ligand at 2.2 Å. The effect on rusticyanin is even more drastic and can be attributed to the longer Cu(II)-S<sub>γ</sub>(Cys) bond (note that the longer Cu-Cys bond is not imposed by the axial Met ligand interaction; see below).

This work also reveals subtle differences between PsAz and Rc that are not evident from other spectroscopies. The spectral ratio of the LMCT bands ( $\epsilon_{450}/\epsilon_{600}$ ) equals 0.41 in PsAz and 0.47 in Rc, and the EPR patterns are very similar. This is in agreement with the close values of the  $\phi$  angles in both proteins (Table 5), which predicts a similar degree of tetragonal distortion. Instead, NMR data reveal that strikingly different Cu(II)-Cys bonding features can be monitored in PsAz and Rc. This implies that similar tetragonal distortions can be induced by different metal-ligand interactions and that the geometric distortion of the metal site, and not exclusively the copper-axial ligand interaction, is able to affect the electronic structure of type 1 sites. Finally, we conclude that the structural features that govern the electron spin density on each copper ligand differ from those giving rise to the tetragonal distortion.

The crystal structures indicate that, although the Cu(II)-S<sub>δ</sub>(Met) in rusticyanin is slightly longer when compared to those in pseudoazurin and plastocyanin (see Table 5), the Cu(II)-S<sub>γ</sub>(Cys) bond is also long. It can also be concluded that the strength of Cu(II)-S<sub>γ</sub>(Cys) and Cu(II)-S<sub>δ</sub>(Met) interactions may be independently modulated in tetragonally distorted type 1 sites. This would agree with the data from the crystallographic structures of blue and green NiRs, where no observable differences in the Cu(II)-S<sub>δ</sub>(Met) distances have been found; in fact, only a significant difference in the HisC-Cu-Met angle is observed between the blue and perturbed (i.e., green) sites.<sup>15</sup>

This observation is in conflict with the trend observed in the azurin-plastocyanin-stellacyanin series, in which a shorter copper-axial ligand bond was shown to give rise to a decreased Cu(II)-S<sub>γ</sub>(Cys) covalence.<sup>23</sup> However, this correlation may hold for classic and tetrahedrally perturbed sites, in which the axial perturbation displaces the copper ion out from the equatorial plane, with no significant angular distortions.

The Cys and Met ligands in all cupredoxins are located near the  $\beta$ -strands in the loop containing the exposed HisC ligand (Figure 5).<sup>1</sup> These residues exhibit a low backbone mobility, as revealed by NMR relaxation studies in different cupredoxins.<sup>24,69,70,71</sup> The  $\beta$ -sheets could then fix the Cys and

(68) Guss, J. M.; Merritt, E. A.; Phizackerley, R. P.; Freeman, H. C. *J. Mol. Biol.* **1996**, *262*, 686-705.



Met orientations and distances to the copper ion. This is in agreement with an elegant “loop-mutagenesis” study, in which several loops imitating different BCP ligand loops were inserted in amicyanin.<sup>59</sup> Resonance Raman spectra of these mutants revealed that the Cu–S<sub>γ</sub>(Cys) interactions were the same for all the chimeric proteins; i.e., cysteine (as methionine)–metal relative orientations and interactions were governed by their position in their β-strands, not in the mutant loops.<sup>59</sup> Moreover, an amicyanin mutant with the PsAz loop exhibited a perturbed type 1 site, but the mutant did not reproduce the spectral features of pseudoazurin. The present NMR data are fully consistent with the conclusions from the loop mutagenesis study. Inspection of Figure 5 confirms this view, since pseudoazurin and plastocyanin possess a similar loop spacing and loop conformation, but different electronic structures due to the relative orientation of the Cys and Met ligands. Instead, pseudoazurin and rusticyanin display a similar tetragonal distortion, notwithstanding the differences in the loop conformation.

HisC is in the middle of the mentioned loop (Figure 5), in such a way that this ligand could adopt different conformations in the copper site. However, the fairly constant hyperfine shifts observed for this histidine in all BCPs (Table 3) indicate that the orientation of the copper ligand HisC is governed by the Cu–N<sub>δ1</sub>(His) interaction. Therefore, an intricate ensemble of interactions (mostly determined by the β-barrel fold and not by the loop) contributes to determine the geometric and electronic structure of tetragonally distorted sites.

**Implication in BCPs’ Redox Potentials.** Factors governing the thermodynamics of the redox process in BCPs have been studied recently by Sola and co-workers.<sup>72–74</sup> Enthalpic effects, mainly due to metal–ligand interactions and metal site electrostatics, mostly govern redox potentials, even if entropic contributions are not negligible at all.<sup>73</sup> NMR allows us to evaluate the different metal–ligand interactions, thus directly providing information on the enthalpic term.

Rusticyanin displays the highest redox potential among BCPs (680 mV),<sup>36,39,46</sup> which has been partially attributed to the highly hydrophobic environment of the metal site<sup>36,41,43,44</sup> and the substitution of Ser for Asn adjacent to the HisN ligand.<sup>46</sup> The side-chain oxygen of Ser86 in the structure of the native protein<sup>75</sup> (and also in M148Leu<sup>76</sup> and M148Gln<sup>77</sup> structures) forms two hydrogen bonds. The first is a tight [2.73 Å (2.79, 2.98 Å)] bond to the backbone nitrogen of Gln139, while the second H-bond links to the side-chain oxygen of Asp88 [2.9 Å (2.72, 2.97 Å)]. Additionally, the backbone nitrogen of Ser86 provides a hydrogen bond to the sulfur of the copper ligand Cys138. This H-bond interaction is expected to directly affect the copper redox potential. Substitution of Ser86 by site-directed

mutagenesis results in a lowered redox potential, in agreement with this proposal.<sup>46</sup> Figure 6C gives evidence that the unpaired spin density residing on this NH exhibits a larger contact shift than that expected from the trend displayed by other BCPs, suggesting a less negative character in the sulfur atom. This feature clearly destabilizes the oxidized species in Rc, raising the redox potential. Our results thus allow us to describe the effects induced by Ser86 on the electronic structure of the copper site in rusticyanin.

The β-CH<sub>2</sub> Cys δ<sub>1/2</sub> value in Rc is the lowest in the BCP series (Figure 6B). However, no correlation between the redox potential and the chemical shifts in these BCPs has been found. The copper–S<sub>δ</sub>(Met) interaction may also contribute to the redox potential in BCPs.<sup>11,78</sup> However, the contribution of the Cu–S<sub>δ</sub>(Met) bond to the redox potential in BCPs is difficult to estimate quantitatively. It is interesting to note that azurin shows a higher redox potential in the unfolded state than in the folded form,<sup>10,11</sup> notwithstanding the higher degree of solvent exposure of the metal site. NMR studies have demonstrated that the axial Met is detached from the metal ion in partially unfolded azurin.<sup>79</sup> On the basis of these considerations, a weaker Cu–S<sub>δ</sub>(Met) interaction in rusticyanin could further contribute to destabilize the Cu(II) state, thus raising the redox potential.<sup>9</sup>

## Conclusions

Here we have learned the following: (1) NMR provides an accurate description of the electron spin density around the copper(II) ion in BCPs. This technique reveals subtle differences that are not evident in optical nor in EPR spectra but correlate with results from high-resolution crystal structures. (2) The electron spin density in the Cys ligands in tetragonally distorted BCPs is decreased compared to that in classic type 1 sites, but this is not necessarily related to a stronger interaction with the axial ligand. (3) The Cu–Cys and the Cu–Met interactions may be independently tuned by the protein folding around the metal site in tetragonally distorted blue copper sites. (4) The β-CH<sub>2</sub> Cys δ<sub>1/2</sub> and the δ<sub>con</sub> of the NH Asn reflect the electron spin density in the S<sub>γ</sub>(Cys) atom, which can be accounted for by geometric features of the metal site (the Cu–S<sub>γ</sub>(Cys) distance and the angle between the CuN<sub>His</sub>N<sub>His</sub> plane and the Cu–S<sub>γ</sub>(Cys) vector) that do not correlate with the degree of tetragonal distortion. The proposed correlation might have predictive value. (5) The electron spin density in S<sub>γ</sub>(Cys) atom in rusticyanin is substantially reduced, notwithstanding the long Cu(II)–S(Met) bond. This might be due to the distinct hydrogen-bonding interaction with Ser86 NH, in contrast to the general trend followed by other BCPs.

**Acknowledgment.** B.J. thanks the Conselleria de Educació y Ciencia (Generalitat Valenciana) for a grant. This work has been supported with financial aid from the DGICYT-Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain (PB98-1444); by UK’s research

- (69) Bertini, I.; Ciurli, S.; Dikiy, A.; Fernandez, C. O.; Luchinat, C.; Safarov, N.; Shumilin, S.; Vila, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2405–2413.  
 (70) Kalverda, A. P.; Ubbink, M.; Gilardi, G.; Wijmenga, S. S.; Crawford, A.; Jeuken, L. J.; Canters, G. W. *Biochemistry* **1999**, *38*, 12690–12697.  
 (71) Reader, J. S.; Van Nuland, N. A.; Thompson, G. S.; Ferguson, S. J.; Dobson, C. M.; Radford, S. E. *Protein Sci.* **2001**, *10*, 1216–1224.  
 (72) Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Loschi, L.; Menziani, M. C.; De Rienzo, F.; Sola, M. *Biochemistry* **2001**, *40*, 6422–6430.  
 (73) Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Loschi, L.; Righi, F.; Sola, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 501–506.  
 (74) Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Canters, G. W.; de Waal, E. C.; Loschi, L.; Warmerdam, G. C. M.; Sola, M. *Biochemistry* **2001**, *40*, 6707–6712.  
 (75) Harvey, I.; Hao, Q.; Duke, E. M.; Ingledew, W. J.; Hasnain, S. S. *Acta Crystallogr. D* **1998**, *54*, 629–635.  
 (76) Kanbi, L. D.; Antonyuk, S.; Hough, M. A.; Hall, J. F.; Dodd, F. E.; Hasnain, S. S. *J. Mol. Biol.* **2002**, *320*, 263–275.  
 (77) Hough, M. A.; Hall, J. F.; Kanbi, L. D.; Hasnain, S. S. *Acta Crystallogr. D* **2001**, *57*, 355–360.

- (78) Solomon, E. I.; Penfield, K. W.; Gewirth, A. A.; Lowery, M. D.; Shadle, S. E.; Guckert, G. A.; LaCroix, L. B. *Inorg. Chim. Acta* **1996**, *243*, 67–78.  
 (79) Romero, C.; Moratal, J. M.; Donaire, A. *FEBS Lett.* **1998**, *440*, 93–98.  
 (80) Guss, J. M.; Bartunik, H. D.; Freeman, H. C. *Acta Crystallogr. B* **1992**, *48*, 790–811.  
 (81) Hart, P. J.; Nersissian, A. M.; Herrmann, R. G.; Nalbandyan, R. M.; Valentine, J. S.; Eisenberg, D. *Protein Sci.* **1996**, *5*, 2175–2183.  
 (82) Cunane, L. M.; Chen, Z. W.; Durlley, R. C. E.; Mathews, F. S. *Acta Crystallogr. D* **1996**, *52*, 676–686.

council grant (BBSRC 719/B14224); by grants from ANPCyT (PICT98 01-03544) and Fundación Antorchas to C.O.F.; and by Grants-in-Aid for Scientific Research (No. 13640553) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan to T.K. C.O.F. and A.J.V. are staff members at CONICET. A.J.V. is an International Research Scholar of the Howard Hughes Medical Institute. The European Large

Scale Facility PARABIO at the University of Florence, Italy (Contract No. HPRI-CT-1999-00009), is acknowledged for providing access to the 800 MHz spectrometer and for further support. B.J. and C.O.F. thank CERM (University of Florence) for the hospitality during their stay in Florence.

JA0267019

# Backbone Dynamics of Rusticyanin: The High Hydrophobicity and Rigidity of This Blue Copper Protein Is Responsible for Its Thermodynamic Properties<sup>†</sup>

Beatriz Jiménez,<sup>‡</sup> Mario Piccioli,<sup>§</sup> José-María Moratal,<sup>‡</sup> and Antonio Donaire<sup>\*||</sup>

Departamento de Química Inorgánica, Universitat de València, C/ Dr. Moliner, 50, 46100-Burjassot (Valencia), Spain, Department of Chemistry and CERM, University of Florence, Via L. Sacconi, 6, 50019-Sesto Fiorentino (Florence), Italy, and Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández, Edificio Torregaitán, Avda. Ferrocarril s/n, 03202-Elche (Alicante), Spain

Received April 30, 2003; Revised Manuscript Received July 2, 2003

**ABSTRACT:** Local dynamics and solute–solvent exchange properties of rusticyanin (Rc) from *Thiobacillus ferrooxidans* have been studied by applying heteronuclear (<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N) NMR spectroscopy. <sup>15</sup>N relaxation parameters have been determined for the reduced protein, and a model-free analysis has been applied. The high average value of the generalized order parameter, *S*<sup>2</sup> (0.93), indicates that Rc is very rigid. The analysis of cross correlation rates recorded in both the reduced and the oxidized forms conclusively proves that Rc possesses the same dynamic features in both oxidation states. The accessibility of backbone amide protons to the solvent at different time scales has also been studied by applying specific heteronuclear pulse sequences and by H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O exchange experiments. These experiments reveal that rusticyanin is extremely hydrophobic. The first N-35 amino acids, not present in the other BCPs, protect the β-barrel core from its interaction with the solvent, and thus, this is one of the main factors contributing to the hydrophobicity. Both characteristics (high rigidity and hydrophobicity) are maintained in the metal ion surroundings.

The thermodynamic properties of the blue copper protein (BCP)<sup>1</sup> rusticyanin (Rc) represent an intriguing issue in protein and copper biochemistries (1–7). BCPs are small soluble electron-transfer proteins containing a copper ion, which can be copper(I) or copper(II). All BCPs have a very rigid β-barrel structure that allows electron transfer to take place with a minimum reorganization energy (1). An extensive network of hydrogen bonds as well as tertiary interactions keep the tridimensional BCP structures. Rusticyanin can tolerate a wide range of pHs and is extremely stable at pH values lower than 2 (8–10). Rusticyanin is found in the Gram negative bacterium *Thiobacillus ferrooxidans* (*Tf*), where it constitutes the most abundant protein (ca. 6.5% of the weight of the soluble proteins in *Tf* corresponds to rusticyanin) (11, 12). This organism extracts its energy by oxidizing iron(II) ions from the acidic environment in which it is found (13). Rc is probably the first acceptor in the electron transfer chain. The structural properties that provide

Rc with its high stability over a wide pH range have been extensively analyzed by X-ray crystal diffraction (14–19), nuclear magnetic resonance (NMR) (20–22), and other spectroscopies (23–25), both in its native form and with different mutants (19, 26). The fact that Rc possesses a β-barrel core that is more shielded from solvent in comparison with other BCPs has been proposed as one of the major factors determining these properties (16, 17). Indeed, with 155 amino acids (it is the largest known BCP), Rc contains an N-terminal extension of 35 amino acids, not present in other BCPs. Recently, Hasnain et al. have studied the solution structure of a mutant with this N-35 extension deleted (N-35Rc) (27). This extension is directly implicated in keeping the high degree of hydrophobicity of the protein but not in its resistance to acidic media (27).

Rusticyanin also has an extremely high redox potential, which is found to be 300–500 mV higher than that of the other BCPs (7, 25). Factors responsible for the extraordinary stabilization of the reduced form, Cu(I), in rusticyanin have also been discussed. Among these, the hydrophobicity of the active site (16, 22, 28) and the presence of a Ser at position 86 adjacent to the Cu ligand His85 (instead of an Asn, at the equivalent position in most other BCPs), which makes a hydrogen bond with the Sγ atom of the coordinated cysteine (15, 25), are supposed to be particularly influential.

NMR is the technique that allows direct evidence on the dynamic range of the backbone mobility in proteins (29–33). It permits the characterization of the most mobile regions of a polypeptide chain as well as the time scale (pico-, nano-, or milliseconds) in which these movements occur. The degree of exposure to water molecules can also be determined by

<sup>†</sup> This work has been supported with financial aid from the DGICYT-Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain (BQU2002-02236, PB98-1444). The support from the European Large Scale Facility PARABIO at the University of Florence, Italy (Contract HPRI-CT-1999-00009) is acknowledged. B.J. and M.P. thank the Conselleria de Educació y Ciencia (Generalitat Valenciana) for a grant.

\* Corresponding author. Phone: 34-96-6658942. Fax: 34-96-6658758. E-mail: adonaire@umh.es.

<sup>‡</sup> Universitat de València.

<sup>§</sup> University of Florence.

<sup>||</sup> Universidad Miguel Hernández.

<sup>1</sup> Abbreviations: Az, azurin; BCP, blue copper protein; ccr, cross correlation rates; NMR, nuclear magnetic resonance; NOE, nuclear Overhauser effect; Pc, plastocyanin; PsAz, pseudoazurin; Rc, rusticyanin; *Tf*, *Thiobacillus ferrooxidans*.

Table 1: Alignment of Secondary Structure Elements Present in Rc, Az, PsAz, and Pc. Residue Numbers Including These Elements Are Given for Each BCP

secondary structure element <sup>a</sup>	residue number in:			
	Rc <sup>b</sup>	Az <sup>c</sup>	PsAz <sup>d</sup>	Pc <sup>e</sup>
<i>β</i> -strand I <sup>f</sup>	8–10			
helix V <sup>f</sup>	11–20			
<i>β</i> -strand II <sup>f</sup>	25–27			
<i>β</i> -strand III <sup>f</sup>	30–33			
<i>β</i> -strand IV	36–45	3–10	2–8	1–6
<i>β</i> -strand V	53–57	14–16	17–19	13–15
<i>β</i> -strand VI <sup>f</sup>	59–61			
<i>β</i> -strand VII	63–66	18–22	22–25	17–21
<i>β</i> -strand VIII	71–79	27–36	30–34	26–33
loop(80–119)	80–119	37–90	35–63	34–66
		<i>β</i> -strand <sup>h</sup> 46–51		40–42
ligand 1	His85	His46	His40	His37
		helix <sup>h</sup> 55–67		
turn 93–97 <sup>g</sup>	93–97	74–76	52–56	46–49
<i>β</i> -strand IX	120–127	91–98	64–67	67–74
		helix <sup>h</sup> 100–102		
<i>β</i> -strand X	132–138	108–112	72–78	78–84
ligand 2	Cys138	Cys112	Cys78	Cys84
ligand 3	His143	His117	His81	His 87
helix II <sup>f</sup>	144–146			
ligand 4	Met148	Met121	Met86	Met92
<i>β</i> -strand XI	148–155	121–128	86–92	92–99
			helix <sup>i</sup> 99–104	
			helix <sup>i</sup> 109–122	

<sup>a</sup> The numeration of the secondary structure elements is given according to rusticyanin sequence. <sup>b</sup> *Tf* rusticyanin (16, 22). <sup>c</sup> *P. aeruginosa* azurin (40). <sup>d</sup> *P. pantotrophus* pseudoazurin (41). <sup>e</sup> *Synechocystis* sp. PCC6803 plastocyanin (42). <sup>f</sup> These elements, written in italics, are unique of Rc (for the sake of clarity, they are located in the right side of the first column). <sup>g</sup> Turn 93–97 in Rc is aligned with regions described in Table 1 for the other BCPs on the basis of the similar mobility pattern (see text). <sup>h</sup> Elements only present in Az. <sup>i</sup> Elements exclusive of PsAz.

D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O exchange experiments. Moreover, NMR spectroscopy reveals the position of the solvent molecules buried inside the protein (34–39). Water–protein interactions studied by applying this technique provide important information on the degree of hydrophobicity of a protein, on the regions more exposed to the solvent, and on the time scale of such protein–water interactions. The knowledge of the dynamic properties of Rc and the recognition of the residues that interact with water molecules are important to identify the factors that provide Rc with its stability features at low pH values.

The dynamic behavior of three BCPs has been already determined: azurin (Az) from *Pseudomonas aeruginosa* (40), pseudoazurin (PsAz) from *Paracoccus pantotrophus* (41), and plastocyanin (Pc) from *Synechocystis* sp. PCC6803 (42). Like all BCPs, a *β*-barrel represents the main structural element for these proteins. Pc, the smallest BCP, presents the basic tertiary structures of these proteins. Additional secondary structural elements are present in some of them but not in others. For instance, the N-35 extension of Rc contains three *β*-strands and an *α*-helix not present in the rest of BCPs. For the sake of clarity, we report the residue alignment of Rc and these three BCPs in Table 1. The three cited BCPs (Az, PsAz, and Pc) are highly rigid and show a similar mobility pattern for equivalent regions of the proteins (40–42). Only Pc has been characterized in the two redox states of the copper ion, although no significant differences

have been found between the dynamic properties of Cu(I) and Cu(II) plastocyanin (42).

We have tried here to relate the structural elements peculiar to Rc with its dynamic properties and to explain how internal mobility affects its unique thermodynamic features (i.e., stability at low pH and high redox potential).

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**NMR Sample Preparation.** Rusticyanin labeled with <sup>15</sup>N or with <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N was obtained from cultures of *Escherichia coli* strains BL21(DE3) containing the rusticyanin plasmid (10). A slightly modified M9 minimum medium (Glucose 8.0 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20.0 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 18.2 g/L, NaCl 1.0 g/L, <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl 1.0 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 M solution 2 mL/L, and CaCl<sub>2</sub> 1 M solution 400  $\mu$ L/L) was used. Ampicillin (concentration 200 mg/mL) was also added to the culture in a ratio of 1 mL/L. Two L of this medium was inoculated with 50 mL of *E. coli* cells and kept at 38 °C for 5 h. Then, 400  $\mu$ L/L isopropyl-*β*-thiogalactopyranoside, IPTG, solution (200 mg/L) was added to induce protein expression. After ca. 20 h, the cells were collected. Labeled <sup>15</sup>N rusticyanin was obtained and purified as previously described (10). The yield typically was ca. 70 mg of protein/L of culture medium. Samples were then concentrated in H<sub>2</sub>O, acetate buffer 100 mM, pH 5.5 with Biomax–5K NMWL membrane (15 mL) and centricons (3 mL) both from Millipore. For copper(I) rusticyanin measurements, metal reduction was achieved by adding small quantities of sodium dithionite. For the measurements performed in oxidized samples, an excess of sodium ferricyanide was added with the opposite aim. In both cases, the sample was washed to eliminate the excess of reducing or oxidizing agent, prior to NMR measurements.

For the H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O exchange experiments, a sample in H<sub>2</sub>O (1.2 mM, acetate buffer 100 mM, pH 5.5) was washed against a D<sub>2</sub>O solution at the same conditions in Millipore centricon devices, and the <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N heteronuclear single quantum correlation (HSQC) spectra (43) of this freshly prepared sample was recorded (0 h). Then, HSQC experiments in analogous experimental conditions were recorded every hour during the first 8 h and then at increasing periods over 14 days.

**NMR Measurements.** NMR experiments were performed at 296 K both in a Bruker Avance 500 or in a Bruker Avance 600 spectrometer operating at magnetic fields of 11.7 and 14.1 T, respectively. <sup>1</sup>H and <sup>15</sup>N frequencies were, respectively, 500.13 (600.13) and 50.68 (60.81) MHz for a magnetic field of 11.7 (14.1) T. <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N HSQC experiments (43) were recorded before and after each experiment to check the state of the sample. The assignment of the <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N HSQC cross peaks was performed by comparison with data available in the literature (20). In the reduced state, a 3-D <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N HSQC-TOCSY experiment (44) (with 50 ms of spin lock) was carried out to distinguish any ambiguities that may occur between the chemical shifts in our working conditions and the previously reported assignment. For the oxidized state (not previously assigned), the uncertainties were eliminated with an HNCA experiment (45, 46) using a previous assignment of <sup>13</sup>C carbon resonances in the reduced state (21).

<sup>15</sup>N longitudinal, *R*<sub>1</sub> (31), and transversal, *R*<sub>2</sub> (31, 47), relaxation rates as well as <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N NOE (48) values were

measured by using the pulse sequences previously reported on a Cu(I) Rc sample (3.0 mM, acetate buffer 100 mM, pH 5.5, 296 K). For  $R_1$  measurements, eight experiments with  $^{15}\text{N}$  recovery delays of 10, 60, 130, 150, 250, 290, 500, and 800 ms were performed. The relaxation delay after the acquisition time was 3 s. Another eight experiments with  $^{15}\text{N}$  recovery delays of 6.9, 13.8, 27.6, 48.3, 75.9, 110.4, 151.8, and 207 ms during the transversal evolution of the  $^{15}\text{N}$  nucleus were carried out to determine their  $R_2$  values. Water suppression was achieved by an echo-antiecho scheme (49). For the determination of  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NOE values, three experiments with  $^1\text{H}$  presaturation for 2.5 s and one without were performed. In this last case, the strong solvent signal was partially eliminated by a flip-back approach (48). For  $R_2$  and  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NOE experiments, 3.2 s of recycle time was employed to ensure the complete nuclei relaxation.

Measurements of cross correlation rates occurring between  $^{15}\text{N}$  chemical shift anisotropy (csa) and  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  dipole-dipole relaxation were performed using the pulse sequence described by Tjandra et al. (50). The duration of the dephasing delays used were 23.4, 34, 48, and 66 ms. These experiments were taken both in a reduced and in an oxidized sample (acetate buffer 100 mM, pH 5.5, 296 K in both cases). Experiments to determine amide proton in exchange with the bulk solvent,  $^{15}\text{N}$ -(CLEANEX-PM)-FHSQC (cleanex experiment, hereafter) (51), and with water molecules residing in the protein for a time longer than the correlation time (ePHOGSY) (52, 53) have also been performed in a reduced sample (acetate buffer 100 mM, pH 5.5) by applying the previously reported pulse sequences.

In all heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC experiments,  $2048 \times 220$  data points were collected in the  $^1\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$  dimensions, respectively. For relaxation and NOE measurements, spectral windows of 13.0 and 30.0 ppm for  $^1\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$  nuclei were used. For cleanex and ePHOGSY experiments, the spectral windows were enlarged in both dimensions (25.0 and 100 ppm in  $^1\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$ , respectively) to observe histidine imidazole  $\text{H}\epsilon 1$  protons. The carrier signal was set to the  $\text{H}_2\text{O}$  signal in all cases. FIDs were apodized to a final data matrix of  $2048 \times 1024$  points, zero filled, weighted with Gaussian and sine square (shifted  $60^\circ$ ) functions in acquisition and evolution dimensions, respectively, and Fourier transformed. Only the downfield part of the  $^1\text{H}$  spectra, containing the H-N connectivities, was kept for the data analysis. The cross peaks were integrated using the standard routine of the Bruker XWINNMR program.

**Data Analysis.** Relaxation rates,  $R_1$  and  $R_2$ , were determined by fitting the cross peak intensities of the corresponding experiments to a single-exponential decay by using the Levenberg-Marquardt algorithm (54, 55), according to the following expression:  $I(t) = A + B \exp(-R_i t)$ , where  $A$ ,  $B$ , and  $R_i$  (with  $i = 1$  or  $2$ ) are adjustable parameters. The parameter  $A$  was set to 0 for transversal relaxation,  $R_2$ , measurements. Uncertainties in  $R_1$  and  $R_2$  values were obtained by using a Monte Carlo approach (56, 57).

The  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NOE values were obtained by the ratio between the intensity of each peak in the experiments with and without presaturation of the amide protons. Errors were taken as three times the standard deviation,  $\sigma$ , of the differences in the intensities of the three experiments performed with HN presaturation.

The analysis of the overall tumbling of Rc was performed from the  $R_2/R_1$  ratios of each H-N pair by the program Quadric Diffusion 1.11 (58). The average structure (previously minimized) of the rusticyanin family of structures (1cur (22) from the Protein Data Bank, PDB) was used in these calculations.  $R_2/R_1$  values larger than twice the standard deviation ( $\sigma$ ) of the average value were eliminated (59). This process was repeated until all values fell within the average value  $\pm 2\sigma$ . Throughout this article, the same criterium has been taken for discerning among data that do and do not deviate from the average value. This has allowed us to discriminate H-N pairs with individual dynamic behavior from those with the same pattern as the overall protein frame. The diffusion parameters corresponding to isotropic, axially symmetric, and fully anisotropic models were tested (57, 60). The  $F$  factor (61, 62) was used to check the statistical improvement of the fitting to each model.

The relaxation data ( $R_1$ ,  $R_2$ , and  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NOE) were analyzed according to the model-free approach of Lipari and Szabo (63, 64), by using the program Modelfree 4.0 (60). The spectral density function,  $J(\omega)$ , is given by

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left[ \frac{S^2 \tau_r}{1 + (\omega \tau_r)^2} + \frac{(1 - S)^2 \tau_c}{1 + (\omega \tau_c)^2} \right] \quad (1)$$

where  $\tau_r$  is the correlation time for the overall tumbling of the molecule;  $S^2$  is the order parameter; and  $\tau_c^{-1} = \tau_r^{-1} + \tau_e^{-1}$ , in which  $\tau_e$  is the correlation time for internal motions. The experimental data were adjusted into one of four different previously described models (57, 60). In all the models, the order parameter,  $S^2$ , was always fitted. Model 1, with only a correlation time (the rotational time of the molecule,  $\tau_r$ ) is valid for H-N couples with no internal motions (i.e., within the movement of the whole protein frame) (only  $S^2$  was fitted). Model 2 adds to the fitting a correlation time ( $\tau_c$ ) that accounts for fast (subnanosecond) internal motions. The fitting with model 3 only uses a total correlation time ( $\tau_r$ ), as model 1, but exchange phenomena in the micro-/millisecond time scale are accounted for by an exchange rate,  $R_{\text{ex}}$ , parameter. Model 4 is analogous to model 2 (includes a  $\tau_c$  parameter) and to model 3 (also includes exchange,  $R_{\text{ex}}$ , phenomena). If the sum of squared errors (SSE) was lower than 10 for model 1, then this model was taken as correct for the corresponding H-N. For larger SSE values, models 2 or 3 were applied and assumed as correct if  $\text{SSE} < 10$ . Only for one residue (Leu46, see Results) was model 4 assumed.

Cross correlation rates (ccr) between  $^{15}\text{N}$  and  $^1\text{H}$  dipolar interaction and  $^{15}\text{N}$  csa were obtained from the fitting of the expression:  $I_A/I_B = \tanh(2\Delta\eta)$ , where  $I_A$  and  $I_B$  are the intensities of a given peak for each evolution  $\Delta$  delay in the two experiment schemes previously reported (50), and  $2\eta$  are the ccr values. When no exchange phenomena are present, these ccr values are, in a good approximation, proportional to the generalized order parameter,  $S^2$  (50).

## RESULTS

**Relaxation Data.** From  $^{15}\text{N}$  HSQC experiments, 137 out of the 140 backbone amide groups have been identified. The assignment of the signals was performed by comparison with that previously published (20). A 3-D  $^{15}\text{N}$  HSQC-TOCSY

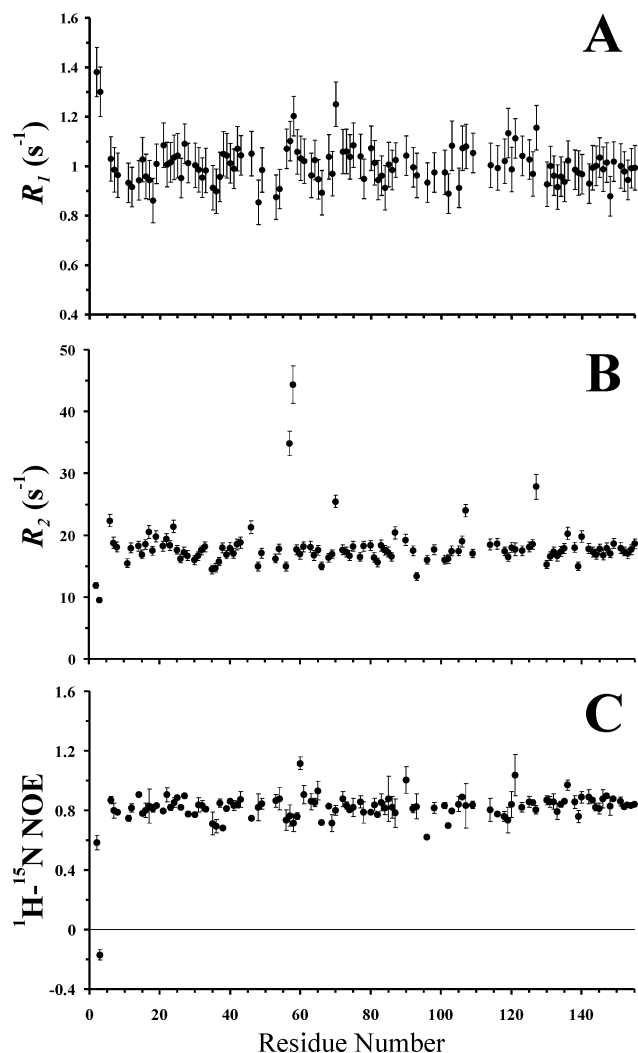


FIGURE 1: Relaxation data for the reduced rusticyanin (3.0 mM, acetate buffer 100 mM, pH 5.5, 296 K): (A) longitudinal relaxation rates ( $R_1$ ); (B) transversal relaxation rates ( $R_2$ ); and (C)  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NOE values.

experiment was used to check the validity of the assignment. As a consequence of different experimental (pH and temperature) conditions, about 30% of the signals change their chemical shifts. However, no inconsistency was found between both assignments. Twenty-six backbone amide peaks were either too weak or overlapped, therefore rendering a complete analysis of their relaxation properties unreliable. The whole body of the relaxation data obtained for 111 peaks is shown in Figure 1A–C.

The average value of the longitudinal relaxation rates ( $R_1$ ) of the  $^{15}\text{N}$  backbone nuclei was  $1.00 \pm 0.06 \text{ s}^{-1}$ . Six residues (Thr2, Leu3, Asp58, Ala70, Lys119, Trp127) exhibit  $R_1$  values larger than the average by more than  $2\sigma$ , suggesting the occurrence of some internal motions. The average value of the transversal relaxation rates ( $R_2$ ) was  $17.4 \pm 1.2 \text{ s}^{-1}$ . Eight residues (Thr6, Gly24, Leu46, His57, Asp58, Ala70, Ala107, and Trp127) have  $R_2$  values significantly larger than this average value. The pattern of Figure 1B clearly shows that the  $R_2$  values in the region 57–58 are unambiguously above the general trend of the molecule. This is indicative of conformational exchange phenomena occurring on time scales longer than the nanosecond time, and thus, contributing to  $R_2$  relaxation for these few residues (31, 60). There are

also some amino acids (Thr2, Leu3, Gly35, Lys36, and Gly93) with  $R_2$  values below the average value (Figure 1B), thus indicating internal motions on the subnanosecond time scale. The average ratio for  $R_2/R_1$  residues calculated for 97 residues (i.e., with those ones whose  $R_2/R_1$  ratios do not exceed twice the standard deviation) is  $17.6 \pm 1.2$ . Given the small spread in  $R_1$  values, the pattern of  $R_2/R_1$  (data not shown) largely follows the behavior of Figure 1B, pointing out those residues that undergo conformational dynamics in the micro-/millisecond time scale.

Eleven residues (Thr2, Leu3, Gly35, Lys36, Val38, Val56, Asp58, Ile66, Gly69, Tyr96, and Ile102) have NOE values lower than twice the standard deviation of the medium NOE. Remarkably, Leu3 NOE is negative, indicating that the N-terminal residues are largely unstructured.

For some of the above amino acids, the occurrence of motional properties on the scale of the correlation time was already indicated by  $R_2$  measurements. Apart from these residues, the average NOE value is  $0.83 \pm 0.04$ . This is very close to the maximum theoretical NOE value (0.835) expected in the case of a protein with no internal motions (57, 60). The results, summarized in Figure 1C, show that four residues (Lys60, Glu65, Thr90, Gly121) deviate their NOE values from the average by more than  $2\sigma$ . In the case of Lys60 and Gly121, which are solvent exposed, this is probably due to the existence of exchange phenomena between the amide protons and the solvent, which may affect the intensity of the signals of the reference experiment (48, 65).

The experimental data, summarized in Figure 1, point out the presence of internal mobility in the N-terminal side of the molecule, in the region spanning amino acids 35–38, and in the regions encompassing the residues 56–58, 66–70, and 93–96. The nature of such internal motions and a more comprehensive understanding of their time scale and efficiency can be analyzed by a model-free analysis.

**Model-Free Analysis.** The inertia tensor calculated for the average NMR structure of Rc (1cur (22) from the PDB) has principal values in the ratio 1.00:0.80:0.71. The individual local correlation times estimated from the  $R_2/R_1$  ratio for each residue were satisfactorily fitted by using the isotropic model. The effective correlation time,  $\tau_e$ , for Rc was 13.2 ns. When axial and fully anisotropic models were considered,  $F$  test values of 3.08 and 0.6 were respectively obtained, indicating no statistically significant improvement of the fit with the increment of parameters. Therefore, all calculations were performed by assuming an isotropic model. The same diffusion model has been found for azurin (40), while an axially anisotropic one was used both for pseudo-azurin (41) and for plastocyanin (42). The simple inspection of the tridimensional structures of these molecules can explain these results. In fact, both Pc and PsAz have close to cylindrical shapes. On the contrary, Rc and Az are more spherical.

The order parameter,  $S^2$ , was calculated for each residue by applying the model-free analysis (57, 60) and according to the four dynamic models mentioned in Experimental Procedures. Figure 2A displays the  $S^2$  values for the 111 residues whose relaxation properties have been determined. Following the procedure described in Experimental Procedures, an average of  $0.93 \pm 0.03$  for the order parameter was obtained. The overall trend of the order parameter

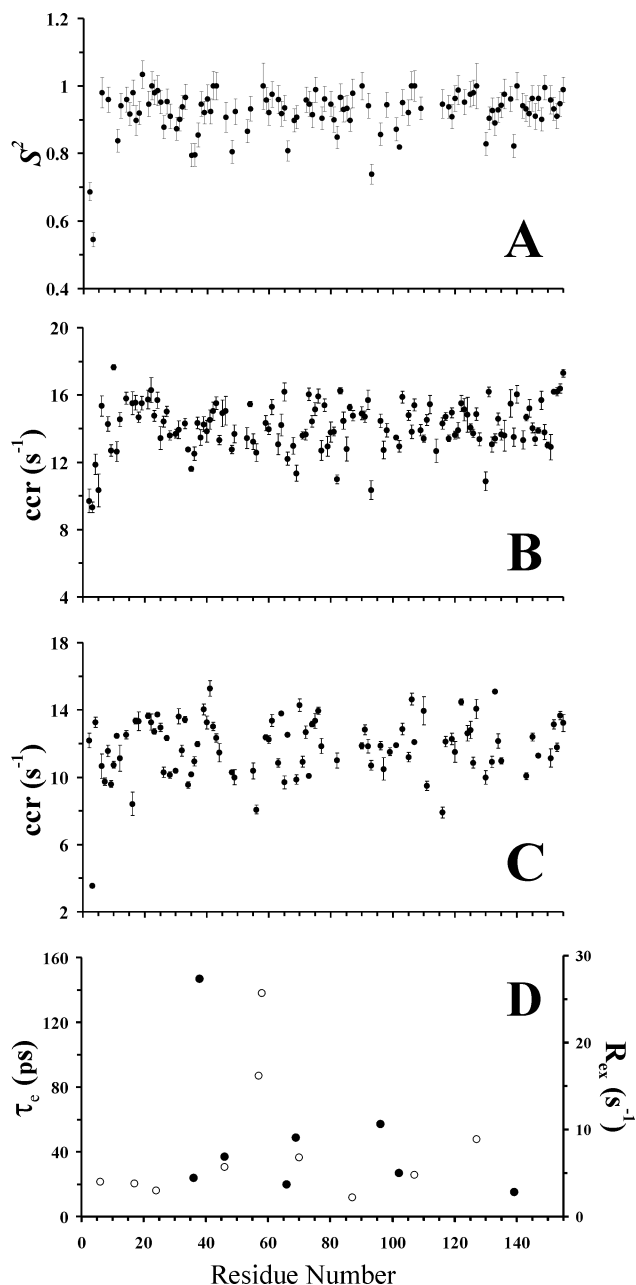


FIGURE 2: (A) Generalized order parameter,  $S^2$ , vs the residue number for the reduced Rc; (B) cross correlation rates for the reduced Rc; (C) cross correlation rates per residue for the oxidized Rc; and (D) correlation times ( $\tau_e$ , plain dots, left y-axis) for residues with fast (subnanosecond) internal motions (these residues have been fitted according to models 2 or 4) and exchange rates ( $R_{ex}$ , open dots, right y-axis) for residues implicated in dynamics in the micro- or millisecond time scale (models 3 or 4).

reflects the secondary structure elements of the protein, with the highest values on the  $\alpha$ -helix (0.93) and the  $\beta$ -strand (0.94) motifs and the largest flexibility in the short loop regions both in the northern and in the southern part of the  $\beta$ -barrel. Ten residues show an  $S^2$  lower than twice the standard deviation: Thr2, Leu3, Gly35, Lys36, Gly48, Ile66, Gly93, Ile102, Thr130, and Gln139. The low values observed for residues 2–3 and 35–36 point out that the mobility of the N-terminus and the 35–37 region is higher than that of the rest of the molecule. The other residues are all located in loop regions. Additionally, they are either adjacent to (Gly48, Ile66, Gly93, and Thr130) or only two residues from (Ile102, Gln139) proline residues, which typically contribute

to local mobility. The four copper bound residues have values spanning from 0.90 to 0.96 and are, therefore, perfectly on average with the mobility of the whole protein.

Ninety-four out of 111 amino acids (84.7%) fit within the model 1 of the model-free analysis. Seven residues (Lys36, Val38, Ile66, Gly69, Tyr96, Ile102, and Gln139) were fitted by taking into account fast internal motions on the subnanosecond time scale (model 2). Two of them, Lys36 and Val38, are located in a region that, on average, has clearly a higher mobility than the rest of the protein. Also, the value observed for Ile66 and Gly69 points out the occurrence of a region, roughly defined between  $\beta$ -strands VII and VIII, with less restricted motions. The same consideration also holds for Tyr96, which is (excluding the N-terminal amino acids) the residue with the lowest order parameter. Tyr96 is located in a Gly-Pro-Pro-Tyr stretch that, in turn, constitutes a part of the 40-residue loop 80–119 connecting strands VIII and IX. The correlation times ( $\tau_e$ ) observed for these residues, shown in Figure 2D, vary between 15 and 147 ps.

Nine residues (Thr6, Ala17, Gly24, Val56, His57, Asp58, Ala70, Ala107, and Trp127) are fitted only when an exchange time constant in the millisecond time scale is introduced (model 3). The model-free analysis also reveals the existence of conformational exchange phenomena ( $R_{ex}$ , Figure 2D) for these residues in time scales longer than the overall molecular tumbling. These exchange rates are in the 2.2–25.7 Hz range. While most of them are lower than 5 Hz, considered as a threshold for the detectability of conformational exchange effects (66), the region His57–Asp58, which corresponds to a tight loop between sheets V and VI, is unambiguously above that limit. Ala70 and Trp127 are also above this threshold. Finally, Leu46 is the only residue that fits according to model 4, with  $\tau_e$  and  $K_{ex}$  values of 37 ps and 5.7 Hz, respectively.

**Cross Correlation Rates. Reduced State.** As already extensively shown in the literature, a quantitative analysis of cross correlation between  $^{15}\text{N}$ – $^1\text{H}$  dipolar interaction and  $^{15}\text{N}$  chemical shift anisotropy (csa) is, within a 5–10%, a good marker of fast internal dynamics (50, 67).

Cross correlation rates (ccr) were safely estimated for 127 out of the 140 NH backbone groups for a copper(I) Rc sample (3.0 mM, acetate buffer 100 mM, pH 5.5). The results, spanning from 17.6 (Ala10) to 9.3 (Leu3)  $\text{s}^{-1}$ , are shown in Figure 2B. As observed, ccr values follow closely the behavior of the  $S^2$  parameters. Thus, both are complementary and consistent, as previously demonstrated in other proteins (50, 67). The average ccr value was  $14.1 \pm 1.0 \text{ s}^{-1}$ . Two regions, the first  $\alpha$ -helix (amino acids 10–20, see Table 1) and the C-terminal  $\beta$ -strand (residues 148–155), display higher values than the average (14.9 and  $15.2 \text{ s}^{-1}$ , respectively). Residues Ala10 and Lys155, which belong to the above regions, possess the highest ccr values of the protein. Besides the amino acids of the N-terminal region, the lowest ccr values correspond to residues Gly35, Gly82, Gly93, and Thr130, belonging to different loops of the protein. With the exception of Gly82 (whose order parameter was not determined), model-free analysis for all these residues is in agreement with ccr data. The Gly82 ccr value suggests that this glycine experiences internal motions on the subnanosecond time scale.

**Cross Correlation Rates. Oxidized State.** Measurements of cross correlation rates were also performed on a Cu(II)

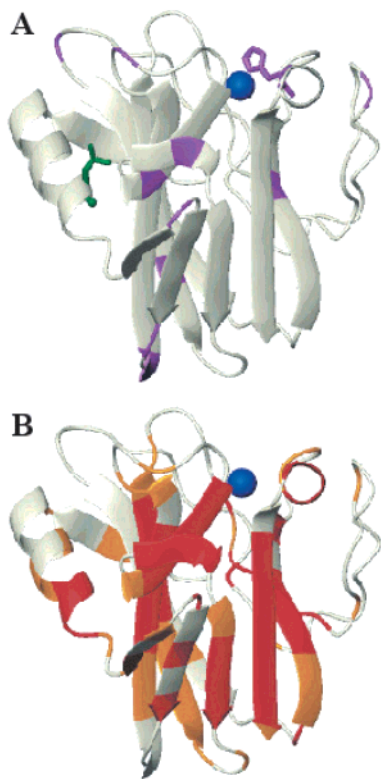


FIGURE 3: (A) Map of the Rc residues with fast exchangeable amide protons in magenta, obtained from the cleanex experiment (1.2 mM, acetate buffer 100 mM, pH 5.5, 296 K). The side chain of His143, with the very fast exchangeable  $\text{NH}\epsilon 2$  proton, is plotted as well. The structural water molecule detected in the ePHOGSY experiment (52, 53) close to Leu19 (see text) is also plotted in green. (B) Schematic view of Rc backbone displaying the amide protons with fast (white), medium (orange), and slow (red)  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  exchange pattern (see text).

oxidized sample (2.2 mM, acetate buffer 100 mM, pH 5.5, Figure 2C). Comparison of ccr values in the reduced and oxidized states showed no significant deviation, except for some residues close to the metal center. This effect is due to the fast relaxation of the nuclei close to the paramagnetic center and is not related with the dynamics of the protein. This unambiguously shows that the mobility features of Rc are essentially independent of the oxidation state of the metal ion.

**Water Exchange.** The cleanex experiment (51) allows the detection of HN amide protons that exchange with the bulk solvent on the millisecond time scale. It enables the identification of those protein regions that are most accessible to the solvent. It appears that most of the residues in Rc are in a high hydrophobic environment, with low accessibility for water molecules. Only 10 residues (Gly28, Ser34, Lys36, Gly48, Val56, Lys60, Asp73, Ala97, Gly118, and Tyr136) are clearly observed in the cleanex experiment (see Supporting Information). Figure 3A displays the location of these residues in the protein architecture (residues in magenta). This pattern shows unambiguously that the region encompassing amino acids 28–36 is quite accessible to the solvent and therefore amenable to undergo exchange phenomena. An inspection of Rc structure shows that this region (which includes the  $\beta$ -strand III, see Table 1) has some amide protons (Gly28, Asp29, Ser34, Gly35, and Lys36) facing toward the solvent.

Other fast exchangeable HN protons, such as Gly48, Gly118, and Ala97, are located in the northern loops of the molecule. The other four amide protons (corresponding to residues Val56, Lys60, Asp73, and Tyr136) are in the  $\beta$ -barrel scaffold. It is interesting to remark that Val56 and Lys60 are close or in  $\beta$ -strand VI (see Table 1) that, in turn, is antiparallel aligned to the  $\beta$ -strand V. This substructure is a singular feature of Rc, and it is not present in the rest of BCPs (27). It is also noticeable that Tyr136 is buried to the solvent by the long loop encompassing residues 80–119. Hence, this loop is flexible enough to allow water molecules to interact with the  $\beta$ -strand X. The largest cross peak of the cleanex 2-D map corresponds to a side chain proton, specifically to  $\text{H}\epsilon 2$  proton of His143, a copper ligand. This provides direct spectroscopic evidence of the degree of the solvent exposure of this imidazole group. In other BCPs, the analogous proton participates in electron auto-transfer via water molecules (68, 69).

To determine the degree of the exposure of amide protons to the solvent over time scales longer than seconds,  $^{15}\text{N}$  HSQC experiments on a fresh sample prepared in  $\text{D}_2\text{O}$  were collected from 3 h to two weeks after the  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  exchange. Forty-seven residues out of the 136 assigned HN groups (34.6%) do not appear in the experiment collected 3 h after the  $\text{D}_2\text{O}$  exchange ( $R_{\text{exch}} > 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ). Fifty residues (36.7%) retain more than 50% of their initial intensity after 11 days ( $R_{\text{exch}} < 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ). The remaining amino acids have an intermediate behavior ( $10^{-6} \text{ s}^{-1} < R_{\text{exch}} < 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ). These results are schematically shown in Figure 3B. The 47 rapid exchanging residues (white color in Figure 3B) are located either at the beginning of the sequence, in the  $\beta$ -strand I, in the 26–37 region (which also involves  $\beta$ -strands II and III), or distributed over the loops connecting the strands of the  $\beta$ -barrel. The longest hydrophilic region corresponds to residues encompassing amino acids 93–130 (involving part of the long loop 79–119 and  $\beta$ -strand IX, see Table 1), which, at the same time, forms an antiparallel  $\beta$ -sheet with  $\beta$ -strand I. Forty out of the 50 slow exchanging residues (red color in Figure 3B) are mainly located in secondary structure elements characteristic of the classical BCP topology: 29 belong to the  $\beta$ -barrel structure; another three are located in the small  $\alpha$ -helix region in the northern part of the molecule close to the copper site (Helix II, see Table 1); and eight are located in loops. The other 10 residues are placed in the N-terminal extension characteristic of Rc, situated at the end of the  $\alpha$ -helix I and in the  $\beta$ -strands II and III (see Discussion).

**Structural Water Molecules.** Peaks observed in the ePHOGSY experiment (52, 53) (data not shown) may arise from a direct NOE between protein groups and a water molecule trapped within the protein frame. However, as already described, other effects can contribute to ePHOGSY peaks in the absence of a real HN–water NOE (37, 39). These are spin diffusion effects during the mixing time, the unwanted NOEs arising from  $\text{H}\alpha$  protons with the same chemical shifts of bulk water, and exchanged relayed NOEs. When all these effects have been properly taken into account (39), only Leu19 HN unambiguously arises from direct HN–water NOEs. This structural water molecule is found between  $\alpha$ -helix I and the  $\beta$ -strands IV, and it is displayed (in green) in Figure 3A.



## DISCUSSION

*Dynamics and Hydration Properties of Rusticyanin versus other BCPs.* The analysis of relaxation data clearly indicates a distinctive feature of Rc with regard to the other BCPs: its high rigidity.

In fact, Rc is the most rigid BCP. The average  $S^2$  ( $0.93 \pm 0.03$ ) as well as the average NOE value (0.83 very close to the theoretical maximum, 0.835) indicate this feature of Rc. This suggests an unusually small degree of internal motion. This rigidity becomes more evident if we compare with the order parameters of Pc (0.87), Az (0.86), and PsAz (0.83). All these BCPs have a high  $S^2$  value (i.e., a very fixed structure). This rigidity is caused by the protein scaffold imposed by the Greek key topology of the  $\beta$ -barrel and the high content in hydrogen bonds. This feature allows electron transfer with a low reorganization energy (1, 2, 70).

It has been argued that the unusual features of Rc are linked to its structural properties, and this is further reinforced by the finding reported here that Rc is considerably more rigid than other BCPs (15, 16, 22). An insight into the specific elements responsible for these properties can be gained if we analyze the dynamic properties of the region encompassing the residues 83–92 (inside the long loop connecting  $\beta$ -strands VIII and IX, Table 1). Although the secondary structure elements for the equivalent region are somewhat different from one BCP to another, its mobility features are analogous for the four studied BCPs (40–42). In fact, this domain has essentially similar values for the order parameter to those of the  $\beta$ -barrel regions (the  $S^2$  average values are 0.93 and 0.94, respectively) (i.e., they are quite rigid even when no specific secondary structure elements are defined in this loop). Azurin, with an  $\alpha$ -helix in this region (helix including residues 55–67 in Az, see Table 1) also shows high  $S^2$  values (from 0.78 to 0.94) (40), although not as high as in Rc. In contrast, the degree of order in PsAz (41) (that lacks of a defined secondary structure for the equivalent residues) is lower than in Az and in Rc. Hence, not only secondary structure elements, but also tertiary interactions, are decisive in providing Rc its extraordinarily high rigidity.

A map of the exposition of amide protons to the solvent in Rc is displayed in Figure 3A,B. This map provides a clear picture of the second most characteristic feature of Rc: its high hydrophobicity. The 36.7% of Rc amide proton (50 out of 136) exchange very slowly ( $R_{\text{exch}} < 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ) (i.e., they are hidden to the solvent). Analogous studies have only been performed in Pc (42). For this BCP, the nonexchangeable amide protons are reduced to 17.2% of the residues (16 out of 93 amide protons). The extension of the hydrophobic core in Rc may be partially due to the simple fact that this is a larger protein; hence, there exists a lower percentage of residues in the surface of the protein. However, there is a unique structural feature of Rc, the first 35 amino acids, that can also account for this high degree of hydrophobicity.

*Distinctive Mobility Properties of the N-35 Terminal Extension.* Rusticyanin possesses 35 amino acids extra, when compared to most other BCPs, that extends the N-terminus (15, 22, 27, 71). This is comprised of the  $\alpha$ -helix (helix I, Table 1) as well as by three  $\beta$ -strands (strands I, II, and III, Table 1), not present in the rest of BCPs.

The residue-by-residue analysis of our data, summarized in Figures 1 and 2, shows two regions with fast internal motions (in the nanosecond time scale): the N-terminal (first five amino acids) region and the loop within the amino acids 34–38. This last loop (which corresponds to the N-terminal region in the rest of BCPs, see Table 1) is then very flexible and seems to act as a linker between two regions. Both  $c_{\text{cr}}$  and  $S^2$  values show that the amino acids encompassing the two mobile regions (the N-terminal and the 34–38 regions) are quite rigid. Moreover, the amphipathic helix I seems to be (together with the C-terminal side) the most rigid part of the molecule. Thus, the region connecting the classic  $\beta$ -barrel to the first part of the molecule (amino acids 34–38) acts as if it couples two different modules: the specific module of Rc (the N-35 extension) and the rest of the protein (the typical BCP topology).

Crystallographic studies reveal that this extension acts as a belt with respect to the typical  $\beta$ -barrel fold (16, 19, 26). Given the peculiar features of Rc, this extension has been postulated to be the driving factor toward the increased acid stability of this protein. Nevertheless, an Rc mutant with the extension 1–35 deleted is still soluble in an acidic environment, being the N-terminal extension responsible for the shielding of the hydrophobic core (27). Our present findings corroborate this last point of view. The N-35 extension serves to increase the hydrophobic nature of the core of the typical  $\beta$ -barrel topology in Rc (27).

*Relaxation NMR Data versus B-Factors Obtained from Crystallographic Structures.* Temperature or B-factors in X-ray diffraction data are an indication about the degree of order (i.e., mobility) of each atom in the solid state. Tridimensional structures of Rc wild type (16) and some of its mutants (19, 26) in the solid state have been reported. Thus, we can compare the B-factors of the amide nitrogen atoms in these structures with our present results. For doing this, we have chosen the two Rc structures deposited in the Protein Data Bank with the best degree of resolution (i.e., Met148Gln 1e30 (19) and Ser86Asp Rc mutants 1gy1 (26) resolved at 1.50 and 1.65 Å, respectively). In these two crystal structures, four regions have B-factors significantly larger than the average value. These are residues 35–37, 47–48, 69–70, and 116–119. The mobility observed in the present work for residues 35–37, 48 (47 is a proline), and 69–70 nicely agrees with X-ray data. Only partial agreement is found between NMR and X-ray data for residues 116–119. In fact, Lys119 has an  $R_1$  value longer than the average (see Results), indicating the existence of fast motions for that amide backbone nitrogen, in agreement with crystal structure data. Cleanex experiment shows that Gly118 is exposed to the solvent and hence predisposed to exchange phenomena. Lys116 and Asp117 seem not to present fast mobility from our NMR data.

A further comment must be said about the B-factors in the N-terminal (residues 2–3) region. In the 1gy1 PDB file, Thr2 and Leu3 show very high B-values, while in the 1e30 PDB file, residue Leu3 has a temperature factor not excessively high. Our data for these two amino acids are clear and conclusive. While in the solid state, the N-terminal residues could be not mobile, in solution they decisively present mobility in the subnanosecond time scale.

*Dynamic Features of the Copper Surroundings.* Three of the copper ligands (Cys138, His143, and Met148) belong to

the last two final  $\beta$ -strands of Rc (Cys138 and Met148, see Table 1) or to the loop interconnecting both (His143). The last  $\beta$ -strand in Rc ( $\beta$ -strand XI) shows a very high  $S^2$  order parameter (0.95). A similar pattern is observed for Pc(42), but Az(40) and PsAz(41) have mobile C-terminal extremes. Additionally, all the amide protons of this  $\beta$ -strand (except that of Met148) do not exchange with the solvent when the protein is dissolved in D<sub>2</sub>O (Figure 3B). The antiparallel partner of  $\beta$ -strand XI,  $\beta$ -strand X, also shows a very similar pattern. Hence, these two  $\beta$ -strands form in Rc one of the most rigid and highly shielded (from solvent interaction) regions of the molecule. This could have two implications in the singular features of Rc. First, the greater protection of the backbone in this C-terminal region would provide an additional stabilizing effect, thus further guarding against denaturation of the protein. Second, the dynamic (and thus, the structural) properties of ligands Cys138 and Met148 (both belonging to these  $\beta$ -strands) will be determined by the interactions of these two  $\beta$ -strands, as we have already proposed (72). Therefore, it is possible that the high rigidity and hydrophobicity of the two antiparallel  $\beta$ -strands X and XI are, in some way, translated to the active center. A highly hydrophobic environment of the copper ion would increase the redox potential of the protein (15, 22, 28) and would be in agreement with the entatic or rack state mechanism for the copper ion (1, 73). It would also explain the facility of the interconversion copper(I)/copper(II) (kinetics behavior). The other two ligands, histidines 85 and 143, also have a very high  $S^2$  value (0.96 and 0.94, respectively), also indicating the high rigidity of the active center.

Cross relaxation rates in Cu(I) and Cu(II) Rc show no significant differences (see Results). Hence, the oxidation state of the metal ion does not alter the dynamic properties of Rc. This has been found previously in Pc (42). The opposite pattern has been found in other electron-transfer proteins such as cytochromes (74). As previously proposed (72), it is likely that the  $\beta$ -barrel scaffold in BCPs is a very high barrier for impeding the free mobility of the copper ion. This occurs in both oxidation states.

*Dynamic Properties of Rc in the Millisecond Time Scale.* Conformational exchange in the millisecond time scale has been observed in azurin for Gly37 (40). This was explained because of the acidic features of His35. This histidine is responsible for the small conformational change of the residues surrounding the metal ion, and as a consequence, the change of the redox potential of azurin with the pH. In PsAz, the equivalent amino acid to Gly37, Lys36, also shows conformational exchange in the same region (41), even when no histidine is present. The equivalent amino acid in Rc is Asn80. No mobility on the millisecond time scale is observed for this residue. In this region, only Thr79 presents fast mobility but in the nanosecond time scale. It is not clear whether this mobility is related to any conformational exchange phenomena analogous to that observed for Az and PsAz occurring on a slower time scale.

On the contrary, the most significant feature regarding motions in the millisecond time scale in Rc (Figures 1B and 2D) is the large exchange rates for residues His57 and Asp58 (16.2 and 25.7 Hz, respectively). This pattern can arise from the protonation/deprotonation behavior of the His57 imidazol ring at the working pH value. The implicated residues belong to the loop interconnecting the strands V and VI, not present

in other BCPs. Interestingly, Val56 and Lys60 (belonging to the same loop) amide protons are in fast exchange with the solvent. It is likely that both exchange in the millisecond time scale and solvent exchange of this loop are related, although its physiological relevance (if it exists) cannot be deduced from the present study.

## CONCLUSION

NMR studies on local dynamics and hydration of Rc contribute to a better understanding of the peculiar thermodynamic features of this protein. Rc has higher rigidity even than other BCPs. This holds not only within the  $\beta$ -barrel scaffold but also in the loop regions. This demonstrates that tertiary interactions are important in determining the dynamics of Rc. The degree of hydrophobicity of Rc is greater than in other BCPs. The N-35 extension, unique to Rc, plays an important role in shielding the  $\beta$ -barrel toward solvent exposure. These features are independent of the redox state of the metal ion. The body of experimental data presently available accounts for a direct relationship occurring between the average order parameter and the reduction potential of the protein. The present study represents an example of how protein dynamics links structure and function.

## ACKNOWLEDGMENT

Drs. S. Samar Hasnain (CCLRC Daresbury Laboratory) and John F. Hall (De Monfort University) are acknowledged for providing us *E. coli* with the Rc plasmid, as well as for many interesting comments.

## SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

The cleanex experiment. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## REFERENCES

1. Gray, H. B., Malmström, B. G., and Williams, R. J. P. (2000) Copper coordination in blue proteins, *JBIC* 5, 551–9.
2. Randall, D. W., Gamelin, D. R., LaCroix, L. B., and Solomon, E. I. (2000) Electronic Structure contributions to electron transfer in blue Cu and CuA, *JBIC* 5, 16–9.
3. Cox, J. C., Aasa, R., and Malmstrom, B. G. (1978) EPR studies on the blue copper protein, rusticyanin: a protein involved in Fe<sup>2+</sup> oxidation at pH 2.0 in *Thiobacillus ferrooxidans*, *FEBS Lett.* 93, 157–60.
4. Shoham, M. (1992) Rusticyanin: Extremes in acid stability and redox potential explained by the crystal structure, *J. Mol. Biol.* 227, 581–2.
5. Ingledew, W. J., and Cocco, D. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 590, 141–58.
6. Blake, R. C., II, and Shute, E. A. (1987) Respiratory enzymes of *Thiobacillus ferrooxidans*. A kinetic study of electron transfer between iron and rusticyanin in sulfate media, *J. Biol. Chem.* 262, 14983–9.
7. Hall, J. F., Kanbi, L. D., Strange, R. W., and Hasnain, S. S. (1999) Role of the axial ligand in type 1 Cu centers studied by point mutations of Met148 in rusticyanin, *Biochemistry* 38, 12675–80.
8. Cogley, J. G., and Haddock, B. A. (1975) The respiratory chain of *Thiobacillus ferrooxidans*: the reduction of cytochromes by Fe<sup>2+</sup> and the preliminary characterization of rusticyanin a novel blue copper protein, *FEBS Lett.* 60, 29–33.
9. Cox, J. C., and Boxer, D. H. (1978) The purification and some properties of rusticyanin, a blue copper protein involved in iron(II) oxidation from *Thiobacillus ferrooxidans*, *Biochem. J.* 174, 497–502.
10. Hall, J. F., Hasnain, S. S., and Ingledew, W. J. (1996) The structural gene for rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans*:

- cloning and sequencing of the rusticyanin gene, *FEMS Microbiol. Lett.* **137**, 85–9.
11. Ingledew, W. J., Cox, J. C., and Halling, P. J. (1977) A proposed mechanism for energy conservation during Fe<sup>2+</sup> oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*: Chemiosmotic coupling to net H<sup>+</sup> influx, *FEMS Microbiol. Lett.* **2**, 193–7.
  12. Ronk, M., Shively, J. E., Shute, E. A., and Blake, R. C., II. (1991) Amino acid sequence of the blue copper protein rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans*, *Biochemistry* **30**, 9435–42.
  13. Blake, R. C., II, Shute, E. A., Greenwood, M. M., Spencer, G. H., and Ingledew, W. J. (1993) Enzymes of aerobic respiration on iron, *FEMS Microbiol. Rev.* **11**, 9–18.
  14. Djebli, A., Proctor, P., Blake, R. C., II, and Shoham, M. (1992) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans*, *J. Mol. Biol.* **227**, 581–2.
  15. Grossmann, J. G., Ingledew, W. J., Harvey, I., Strange, R. W., and Hasnain, S. S. (1995) X-ray absorption studies and homology modeling define the structural features that specify the nature of the copper site in rusticyanin, *Biochemistry* **34**, 8406–14.
  16. Walter, R. L., Ealick, S. E., Friedman, A. M., Blake, R. C., II, Proctor, P., and Shoham, M. (1996) Multiple wavelength anomalous diffraction (MAD) crystal structure of rusticyanin: a highly oxidizing cupredoxin with extreme acid stability, *J. Mol. Biol.* **263**, 730–51.
  17. Harvey, I., Hao, Q., Duke, E. M., Ingledew, W. J., and Hasnain, S. S. (1998) Structure determination of a 16.8 kDa copper protein at 2.1 Å resolution using anomalous scattering data with direct methods, *Acta Crystallogr. D54*, 629–35.
  18. Yu-dong, L., Harvey, I., Yuan-xin, G., Chao-de, Z., Yi-zong, H., Hai-fu, F., Hasnain, S. S., and Hao, Q. (1999) Is single-wavelength anomalous scattering sufficient for solving phases? A comparison of different methods for a 2.1 Å structure solution, *Acta Crystallogr. D55*, 1620–2.
  19. Hough, M. A., Hall, J. F., Kanbi, L. D., and Hasnain, S. S. (2001) Structure of the M148Q mutant of rusticyanin at 1.5 Å: a model for the copper site of stellacyanin, *Acta Crystallogr. D57*, 355–60.
  20. Hunt, A. H., Toy-Palmer, A., Cavanagh, J., Blake, R. C., II, and Dyson, H. J. (1994) Nuclear Magnetic Resonance Assignments and Global Fold of Rusticyanin. Insights into the ligation and acid stability of the Blue Copper Site, *J. Mol. Biol.* **244**, 370–84.
  21. Toy-Palmer, A., Prytulla, S., and Dyson, H. J. (1995) Complete <sup>13</sup>C assignments for recombinant Cu(I) rusticyanin. Prediction of secondary structure from patterns of chemical shifts, *FEBS Lett.* **365**, 35–41.
  22. Botuyan, M. A., Toy-Palmer, A., Chung, J., Blake, R. C., II, Beroza, P., Case, D. A., and Dyson, H. J. (1996) NMR Solution Structure of Cu(I) Rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans*: Structural Basis for the Extreme Acid Stability and Redox Potential, *J. Mol. Biol.* **263**, 752–67.
  23. Holt, S. D., Piggott, B., Ingledew, W. J., Feiters, M. C., and Diakun, G. P. (1990) EXAFS of the type 1 copper site of rusticyanin, *FEBS Lett.* **269**, 117–21.
  24. Nunzi, F., Guerlesquin, F., Shepard, W., Guigliarelli, B., and Bruschi, M. (1994) Active site geometry in the high oxidation potential rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**, 1655–62.
  25. Hall, J. F., Kanbi, L. D., Harvey, I., Murphy, L. M. M., and Hasnain, S. S. (1998) Modulating the Redox Potential and Acid Stability of Rusticyanin by Site-Directed Mutagenesis of Ser86, *Biochemistry* **37**, 11451–8.
  26. Kanbi, L. D., Antonyuk, S., Hough, M. A., Hall, J. F., Dodd, F. E., and Hasnain, S. S. (2002) Crystal Structures of the Met148Leu and Ser86Asp Mutants of Rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans*: Insights into the Structural Relationship with the Cupredoxins and the Multi Copper Proteins, *J. Mol. Biol.* **320**, 263–75.
  27. Grossmann, J. G., Hall, J. F., Kanbi, L. D., and Hasnain, S. S. (2002) The N-terminal extension of rusticyanin is not responsible for its acid stability, *Biochemistry* **41**, 3613–9.
  28. Donaire, A., Jiménez, B., Moratal, J. M., Hall, J. F., and Hasnain, S. S. (2001) Electronic Characterization of the Oxidized State of the Blue Copper Protein Rusticyanin by <sup>1</sup>H NMR: Is the Axial Methionine the Dominant Influence for the High Redox Potential? *Biochemistry* **40**, 837–46.
  29. Palmer, A. G., III. (2001) NMR probes of molecular dynamics: overview and comparison with other techniques, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30**, 129–55.
  30. Dayie, K. T., Wagner, G., and Lefevre, J. F. (1996) Theory and practice of nuclear spin relaxation in proteins, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **47**, 243–82.
  31. Peng, J. W., and Wagner, G. (1994) Investigation of protein motions via relaxation measurements, *Methods Enzymol.* **239**, 563–96.
  32. Palmer, A. G., III, Kroenke, C. D., and Loria, J. P. (2001) Nuclear magnetic resonance methods for quantifying microsecond-to-millisecond motions in biological macromolecules, *Methods Enzymol.* **339**, 204–38.
  33. Bax, A. (2003) Weak alignment offers new NMR opportunities to study protein structure and dynamics, *Protein Sci.* **12**, 1–16.
  34. Brunne, R. M., Lieppinsh, E., Otting, F., Wüthrich, K., and van Gunsteren, W. F. (1993) Hydration of Proteins. A Comparison of Experimental residence times of Water Molecules Solvating the Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor with Theoretical Model Calculation, *J. Mol. Biol.* **231**, 1040–8.
  35. Otting, G., and Lieppinsh, E. (1995) Protein Hydration viewed by high-resolution NMR Spectroscopy: implications for Magnetic Resonance Image Contrast, *Acc. Chem. Res.* **28**, 171–7.
  36. Wider, G. (1998) Technical aspects of NMR spectroscopy with biological macromolecules and studies of hydration in solution, *Prog. NMR Spectrosc.* **32**, 193–275.
  37. Bertini, I., Dalvit, C., Luchinat, C., Huber, J. G., and Piccioli, M. (1997) e-PHOGSY Experiments on a paramagnetic protein: location of the catalytic water molecule in the heme crevice of the oxidized form of Horse Heart Cytochrome *c*, *FEBS Lett.* **415**, 45–8.
  38. Mesgarzadeh, A., Pfeiffer, S., Engelke, J., Lassen, D., and Ruterjans, H. (1998) Bound water in apo and holo bovine heart fatty-acid-binding protein determined by heteronuclear NMR spectroscopy, *Eur. J. Biochem.* **251**, 781–6.
  39. Bertini, I., Huber, J. G., Luchinat, C., and Piccioli, M. (2000) Protein hydration and location of water molecules in oxidized horse heart cytochrome *c* by <sup>1</sup>H NMR, *J. Magn. Reson.* **147**, 1–8.
  40. Kalverda, A. P., Ubbink, M., Gilardi, G., Wijmenga, S. S., Crawford, A., Jeuken, L. J., and Canters, G. W. (1999) Backbone dynamics of azurin in solution: slow conformational change associated with deprotonation of histidine 35, *Biochemistry* **38**, 12690–7.
  41. Thompson, G. S., Leung, Y. C., Ferguson, S. J., Radford, S. E., and Redfield, C. (2000) The structure and dynamics in solution of Cu(I) pseudoazurin from *Paracoccus pantotrophus*, *Protein Sci.* **9**, 846–58.
  42. Bertini, I., Bryant, D. A., Ciurli, S., Dikiy, A., Fernandez, C. O., Luchinat, C., Safarov, N., Vila, A. J., and Zhao, J. (2001) Backbone dynamics of plastocyanin in both oxidation states. Solution structure of the reduced form and comparison with the oxidized state, *J. Biol. Chem.* **276**, 47217–26.
  43. Bodenhausen, G., and Ruben, D. J. (1980) Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.* **69**, 185–9.
  44. Kozmiski, W. (1999) Simplified Multiplet pattern HSQC-TOCSY experiment for accurate determination of long-range heteronuclear coupling constants, *J. Magn. Reson.* **137**, 408–12.
  45. Kay, L. E., Ikura, M., Tschudin, R., and Bax, A. (1990) Three-Dimensional Triple-Resonance NMR Spectroscopy of Isotopically Enriched Proteins, *J. Magn. Reson.* **89**, 496–514.
  46. Farmer, B. T., II, Venters, R. A., Spicer, L. D., Wittekind, M. G., and Müller, L. (1992) A refocused and optimized HNCA: increased sensitivity and resolution in large macromolecules, *J. Biomol. NMR* **2**, 195–202.
  47. Kay, L. E., Nicholson, L. K., Delaglio, F., Bax, A., and Torchia, D. A. (1992) Pulse sequences for removal of the effects of cross correlation between dipolar and chemical-shift anisotropy relaxation mechanisms on the measurement of heteronuclear T1 and T2 values in proteins, *J. Magn. Reson.* **97**, 359–75.
  48. Grzesiek, S., and Bax, A. (1993) The importance of not saturating water in protein NMR. Application to sensitivity enhancement and NOE measurements, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 12593–4.
  49. Sklenar, V., and Bax, A. (1987) Spin-Echo Water Suppression for the Generation of Pure-Phase Two-Dimensional NMR Spectra, *J. Magn. Reson.* **74**, 469–79.
  50. Tjandra, N., Szabo, A., and Bax, A. (1996) Protein Backbone Dynamics and <sup>15</sup>N Chemical Shift Anisotropy from Quantitative Measurement of Relaxation Interference Effects, *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 6986–91.
  51. Hwang, T.-L., van Zijl, P. C. M., and Mori, S. (1998) Accurate quantitation of water–amide proton exchange rates using the

- phase-modulated CLEAN chemical EXchange (CLEANEX-PM) approach with a Fast-HSQC (FHSQC) detection exchange, *J. Biomol. NMR* 11, 221–6.
52. Dalvit, C. (1996) Homonuclear 1- and 2-D NMR experiments for the observation of solvent–solute interactions, *J. Magn. Reson. Ser. B* 112, 282–8.
53. Dalvit, C., and Hommel, U. (1995) Sensitivity-improved detection of protein hydration and its extension to the assignment of fast-exchanging resonances, *J. Magn. Reson. Ser. B* 109, 334–8.
54. Marquardt, D. W. (1963) An Algorithm for least squares estimation of nonlinear parameters, *J. Soc. Ind. Appl. Math.* 11, 431–41.
55. Press, W. H., Flannery, B. P., Teukolsky, S. A., and Vetterling, W. T. (1988) *Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing*, Cambridge University Press, New York.
56. Peng, J. W., and Wagner, G. (1992) Mapping of the spectral densities of nitrogen–hydrogen bond motions in Eglin c using heteronuclear relaxation experiments, *Biochemistry* 31, 8571–86.
57. Palmer, A. G., III, Rance, M., and Wright, J. G. (1991) Intramolecular motions of a zinc finger DNA-binding domain from Xfin characterized by proton-detected natural abundance carbon-13 heteronuclear NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 113, 4371–80.
58. Lee, L. K., Rance, M., Chazin, W. J., and Palmer, A. G., III. (1997) Rotational diffusion anisotropy of proteins from simultaneous analysis of  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$   $\alpha$  nuclear spin relaxation, *J. Biomol. NMR* 9, 287–98.
59. Tjandra, N., Kuboniwa, H., Ren, H., and Bax, A. (1995) Rotational dynamics of calcium-free calmodulin studied by  $^{15}\text{N}$  NMR relaxation measurements, *Eur. J. Biochem.* 230, 1014–24.
60. Mandel, A. M., Akke, M., and Palmer, A. G., III. (1995) Backbone dynamics of *Escherichia coli* ribonuclease HI: correlations with structure and function in an active enzyme, *J. Mol. Biol.* 246, 144–63.
61. Devore, J. (1982) *Probability and Statistics for Engineering and the Sciences*, Brooks/Cole Publishing Company, Monterey, CA.
62. Bevington, P. R., and Robinson, D. K. (1992) *Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences*, McGraw-Hill, Inc., New York.
63. Lipari, G., and Szabo, A. (1982) Model-Free Approach to the interpretation of Nuclear Magnetic Resonance Relaxation in Macromolecules. 1. Analysis of Experimental Results, *J. Am. Chem. Soc.* 104, 4559–70.
64. Lipari, G., and Szabo, A. (1982) Model-Free Approach to the interpretation of Nuclear Magnetic Resonance Relaxation in Macromolecules. 1. Theory and Range of Validity, *J. Am. Chem. Soc.* 104, 4546–59.
65. Kay, L. E., Torchia, D. A., and Bax, A. (1989) Backbone dynamics of proteins as studied by nitrogen-15 inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease, *Biochemistry* 28, 8972–9.
66. Zinn-Justin, S., Berthault, P., Guenneugues, M., and Desvaux, H. (1997) Off-resonance RF fields in heteronuclear NMR. Application to the study of slow motions, *J. Biomol. NMR* 10, 363–72.
67. Fushman, D., and Cowburn, D. (2001) in *Methods in enzymology* (James, T. L., Dötsch, V., and Schmitz, U., Eds.) pp 109–26, Academic Press, San Francisco, CA.
68. Groeneveld, M., Ouwering, M. C., Erkelens, C., and Canters, G. W. (1988)  $^1\text{H}$  Nuclear magnetic resonance study of the protonation behavior of the histidine residues and the electron self-exchange reaction of azurin from *Alcaligenes denitrificans*, *J. Mol. Biol.* 200, 189–99.
69. Moratal Mascarell, J. M., Salgado, J., Donaire, A., Jimenez, H. R., and Castells, J. (1993) 1- and 2-D NMR Studies of the pH Effects on the metal-site geometry in Nickel(II) Azurin from *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 110–2.
70. Langen, R., Colon, J. L., Casimiro, D. R., Karpishin, J. R., Winkler, J. R., and Gray, H. B. (1996) Electron tunnelling in proteins. Role of the intervening medium, *JBIC* 1, 221–5.
71. Nunzi, F., Woudstra, M., Campese, D., Bonicel, J., Morin, D., and Bruschi, M. (1993) Amino acid sequence of rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans* and its comparison with other blue copper proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1162, 28–34.
72. Donaire, A., Jiménez, B., Fernández, C. O., Pierattelli, R., Niizeki, T., Moratal, J. M., Hall, J. F., Kohzuma, T., Hasnain, S. S., and Vila, A. J. (2002) Metal–Ligand Interplay in Blue Copper Proteins Studied by  $^1\text{H}$  NMR Spectroscopy: Cu(II)-Pseudoazurin and Cu(II)-Rusticyanin, *J. Am. Chem. Soc.* 124, 13698–708.
73. Malmström, B. G. (1994) Rack-induced bonding in blue copper proteins, *Eur. J. Biochem.* 233, 711–8.
74. Barker, P. B., Bertini, I., Del Conte, R., Ferguson, D. M., Hajieva, P., Tomlinson, E., Turano, P., and Viezzoli, M. S. (2001) A further clue to understanding the mobility of mitochondrial yeast cytochrome c: a  $^{15}\text{N}$  T1rho investigation of the oxidized and reduced species, *Eur. J. Biochem.* 268, 4468–76.

BI034692Q

# Monitoring the Early Steps of Unfolding of Dicalcium and Mono-Ce<sup>3+</sup>-Substituted Forms of P43M Calbindin D<sub>9k</sub><sup>†</sup>

Beatriz Jiménez,<sup>‡</sup> Luisa Poggi,<sup>§</sup> and Mario Piccioli<sup>\*,§</sup>

*Departamento de Química Inorgánica, University of Valencia, Dr. Moliner, 50, 46100 Burjasot, Valencia, Spain, and Magnetic Resonance Center (CERM), University of Florence, Via L. Sacconi 6, 50019 Sesto Fiorentino, Florence, Italy*

*Received April 22, 2003; Revised Manuscript Received August 27, 2003*

**ABSTRACT:** Early steps of unfolding of P43M Calbindin D<sub>9k</sub> have been evaluated by NMR spectroscopy on the native dicalcium and on the paramagnetic monocerium-substituted derivative. Although at 2 M GdmHCl the protein core maintains its overall folding and structure, amide <sup>15</sup>N R<sub>2</sub> measurements and cross correlation rates between N–H dipole–dipole relaxation and <sup>15</sup>N CSA relaxation reveal a closer and stronger packing of the hydrophobic interactions in the protein as a response to the presence of denaturing agents in solution. A complete reorientation of the Met43 side chain toward the hydrophobic core is accomplished by the disappearance of the millisecond dynamics observed on the native form of Calbindin D<sub>9k</sub>, while cross correlation rates provide evidence that the two-way hydrogen bond between Leu23 and Val61 is broken or substantially weakened. The substitution of the calcium ion in site II with the paramagnetic Ce<sup>3+</sup> ion allowed us to obtain a number of long-range nonconventional constraints, namely, pseudocontact shifts, which were used, together with the NOEs collected on the native state, to monitor subtle structural variations occurring in the non-native state of the protein. Although the average rmsd between the structures of native and non-native states is small (0.48 Å), structural rearrangements could be reliably identified. Our results provide unprecedented information about the behavior of Calbindin D<sub>9k</sub> during the early steps of unfolding. Furthermore, they constitute strong evidence of the efficiency of paramagnetism-based constraints in monitoring subtle structural changes that are beyond the sensitivity of an approach based only on NOE.

Calcium ion is an important second messenger in a wide variety of cellular functions (1). As a consequence, calcium binding proteins make up an abundant and well-studied class of metalloproteins. One group of such proteins is characterized by a helix–loop–helix structure known as an EF-hand (2). Often, two or more EF-hand motifs are connected via a flexible linker segment that may lead to cooperative interactions between the Ca<sup>2+</sup> binding centers. A particularly well studied example of an EF-hand is the small (8.5 kDa) calcium binding protein Calbindin D<sub>9k</sub>. Calbindin D<sub>9k</sub> (Cb hereafter) is a dicalcium binding protein consisting of four helices and two EF-hands joined together by a flexible linker region with one metal ion bound to each of the two loops. The calcium binding ligands are arrayed around the loops in the EF-hand motif and coordinate the calcium ion with a similar geometry

but with different topology of the two loops (2). In the second site (classical EF-hand), most of the ligands are contributed from carboxyl ligands of aspartic and glutamic side chains, with the last being a bidentate Glu ligand. The first site contains a two-residue insertion which leads to an alternation of the loop conformation. This causes the calcium ion to be coordinated by the backbone carbonyls instead of the side chain carbonyls, with the exception of the bidentate Glu that is still present. Site I is therefore termed a “pseudo-EF-hand” (2).

The coordination differences between the two metal binding sites of Cb allow the selective substitution of the calcium ion in site II with a lanthanide (3). Lanthanide ions have long been used as probes for the spectroscopically silent Ca<sup>2+</sup> ion in many calcium ion binding proteins (4–6). Structures of the apo, dicalcium (Ca<sub>2</sub>Cb), and lanthanide-substituted (CaLnCb) complexes have all been determined by either NMR<sup>1</sup> or X-ray diffraction techniques (7–9). Magnetic properties of lanthanide ions have been used to obtain information about the structure and function of the native Ca<sup>2+</sup> systems. There is structural and spectroscopic

<sup>†</sup> This work was supported by European Union Research and Training Network (RTN) Project “Cross correlation between the fluctuations of different interactions: a new avenue for biomolecular NMR” (Contract HPRN-CT-2000-00092) and by RTD Project “Transient NMR” (Contract HPRI-CT-1999-5006). The work has been performed at the EU Large Scale Facility PARABIO (Contract HPRI-CT-1999-00009). B.J. is a fellow of the Marie Curie Training Site NMR in Inorganic Structural Biology (Contract HPMT-2000-000137). B.J. thanks the Generalitat Valenciana for a Ph.D. grant.

\* To whom correspondence should be addressed: Magnetic Resonance Center (CERM), University of Florence, Via L. Sacconi 6, 50019 Sesto Fiorentino, Florence, Italy. Fax: +39 055 457 4253. Phone: +39 055 457 465. E-mail: piccioli@cerm.unifi.it.

<sup>‡</sup> University of Valencia.

<sup>§</sup> University of Florence.

<sup>1</sup> Abbreviations: NMR, nuclear magnetic resonance; CSA, chemical shift anisotropy; HSQC, heteronuclear single-quantum correlation; FHSQC, fast heteronuclear single-quantum correlation; CLEANEX-PM, phase-modulated clean chemical exchange; NOE, nuclear Overhauser effect; WT, wild type; P43G, Calbindin D<sub>9k</sub> mutant with a Pro43 → Gly substitution; P43M, Calbindin D<sub>9k</sub> mutant with a Pro43 → Met substitution. Amino acids are denoted by their standard one- and three-letter codes.

evidence that, despite the differences in charge between the lanthanide and calcium ions, replacement of the latter causes only very minor structural rearrangements (10), thus justifying the use of lanthanides as structural probes.

The four-helix bundle domain is a commonly occurring fold in which the amphipathic helices pack against one another to form a hydrophobic core of nonpolar residues from all four helices. The polar residues on the outer sides of the helices decorate the surface of the domain and solubilize it. The four-helix bundle fold allows extensive changes in tertiary packing to occur without a significant change in the secondary structure. Calbindin D<sub>9k</sub> is supposed to bind calcium after folding, and the metal is known to stabilize the protein (11). Cb has no sulfide bonds and a high surface charge density that leads to significant destabilizing charge–charge repulsion (12) in the apo form. However, the protein is extremely stable ( $T_m \sim 85^\circ\text{C}$ ) (13), pointing to important contributions to the stability from the core residues that more than compensate for the electrostatic repulsions. It has also been reported that the two subdomains produced by cleavage of the linker loop between the two EF-hands form heterodimers when mixed in the presence of Ca<sup>2+</sup> and reconstitute the intact structure (14).

In its Ca<sup>2+</sup>-bound state, the protein is resistant to thermal denaturation and stays folded in 10 M urea (11). We expect that the presence of denaturing agents induces changes to both protein structure and protein dynamics even at concentrations much lower than those in which a decrease in secondary structure content is observed. Even if there is no biological relevance to a partially destabilized Calbindin, such subtle changes should be carefully investigated because they are likely to point out protein regions that are affected by denaturing agents and to identify intramolecular interactions providing the driving force that initiates the folding process.

The structural characterization of proteins under non-native conditions is a key step in understanding relationships between protein folds and protein functions. It can provide valuable insights into several issues of modern biophysics (15–17). NMR spectroscopy is one of the most useful techniques applied for structural characterization of denatured or partially unfolded states (18–27). Both kinetic and thermodynamic aspects of unfolding and refolding processes can be addressed at the atomic level. In this work, we have been interested in studying the effect of the denaturant guanidinium chloride (GdmHCl) on the structural and dynamic properties of the dicalcium, mono-Ce<sup>3+</sup>-substituted, and apo forms of Calbindin D<sub>9k</sub>. We will assess how paramagnetic probes may contribute to the structural characterization of unfolded states, providing reliable long-range distance restraints.

## MATERIALS AND METHODS

### Sample Preparation

Protein expression (28) and purification (29) of both the Ca<sup>2+</sup> and apo forms of the bovine Pro43 → Met (P43M) mutant (30, 31) of Calbindin D<sub>9k</sub> were performed as reported. The P43M mutation eliminates the conformational heterogeneity due to cis–trans isomerism of this proline residue (31). The expression system was a generous gift of S. Forsén. Uniformly <sup>15</sup>N-labeled overexpressed P43M was obtained

from M9 minimal medium containing (<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as the sole nitrogen source. The site II cerium substitution procedure is described elsewhere (3). Apo-Cb was obtained by washing the dicalcium sample with a 0.5 mM solution of DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid). The pH was adjusted to 6.0 with 0.1 M NaOH or 0.1 M HCl. The final concentration of all samples was approximately 1.0 mM with a sample volume of 305 μL (10% D<sub>2</sub>O/90% H<sub>2</sub>O). A 7 M GdmHCl aqueous solution was prepared and its pH adjusted to 6.0 by adding small quantities of NaOH or HCl. Aliquots of this GdmHCl solution were added to NMR samples in successive steps in which the following concentrations of denaturant were achieved: 0.20, 0.41, 0.79, 1.21, 1.65, and 2.08 M. The samples were kept at 4 °C between measurements.

### NMR Experiments

All NMR experiments were carried out at 300 K on Bruker Avance 400 and 700 spectrometers.

**Nonlabeled Ca<sub>2</sub>Cb and CaCeCb Samples.** One-dimensional (1D) NMR experiments using a spectral width of 16 ppm and a recycle time of 1 s were performed after each addition of GdmHCl at 16.4 T (700 MHz proton Larmor frequency). To investigate the region of hyperfine-shifted signals, experiments were also carried out over a 60 ppm spectral width using a recycle delay of 200 ms.

**<sup>15</sup>N-Labeled Ca<sub>2</sub>Cb Sample.** Two-dimensional (2D) <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N HSQC experiments were performed at 16.4 T (700 MHz proton Larmor frequency) after each addition of GdmHCl. Spectra were acquired using 128 × 2048 complex points and spectral widths of 30.0 and 16.0 ppm in the *t*<sub>1</sub> and *t*<sub>2</sub> dimensions, respectively. The <sup>1</sup>H carrier frequency was set coincident with the water resonance; the <sup>15</sup>N carrier frequency was set to 116.0 ppm. The recycle delay was 1 s. A total of four transients were recorded for each complex point. The free induction decays were processed in *F*<sub>2</sub> by apodizing with a cosine bell window function, zero-filling once, and Fourier-transforming. The resulting spectra were phased and baseline-corrected. The *F*<sub>1</sub> interferograms were apodized with a cosine bell window function, zero-filled once, Fourier-transformed, and phase-corrected.

<sup>15</sup>N *R*<sub>2</sub>(1/τ<sub>cp</sub>) relaxation rates at 9.4 T (400 MHz proton Larmor frequency) were measured using the relaxation-compensated Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) pulse sequences previously reported in the literature (32) on the sample containing 2 M GdmHCl. Data were collected for τ<sub>cp</sub> values of 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.6, 10.8, 21.5, and 64.5 ms. Acquisition conditions were the same as those for the <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N HSQC experiment.

Cross correlation between <sup>15</sup>N–<sup>1</sup>H dipolar interaction and <sup>15</sup>N CSA measurements were carried out at 16.4 T (700 MHz proton Larmor frequency) using a previously reported sequence (33) on the sample containing 2 M GdmHCl. Durations for the dephasing delay, during which the buildup of cross correlation takes place, were 46.7, 68, and 132 ms. Fast amide proton exchange rates were measured on the 2 M GdmHCl sample using <sup>15</sup>N (CLEANEX-PM)–FSQC experiments (34, 35) with a mixing time of 100 ms. For both the above experiments, the sample and acquisition conditions were the same as those for the <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N HSQC experiment.

**<sup>15</sup>N-Labeled CaCeCb Sample.** Two-dimensional (2D) <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N HSQC experiments were performed after each addition

of GdmHCl at 16.4 T (700 MHz proton Larmor frequency). The acquisition conditions were the same as those for the measurements with the [<sup>15</sup>N]Ca<sub>2</sub>Cb sample.

**<sup>15</sup>N-Labeled Apo-Cb Sample.** Two-dimensional (2D) <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N HSQC experiments were performed after each addition of GdmHCl at 9.4 T (400 MHz proton Larmor frequency). The acquisition conditions were the same as those for the measurements with the [<sup>15</sup>N]Ca<sub>2</sub>Cb sample.

All NMR data were processed with the Bruker XWIN-NMR software package.

### NMR Restraints

**NOESY Restraints.** The dipole–dipole restraints used in this work are those obtained from NOESY and 1D NOE experiments for Calbindin D<sub>9k</sub> in which the native calcium in site II is replaced with cerium (CaCeCb hereafter), as previously reported (3).

**Pseudocontact Shifts.** Pseudocontact shifts (pcs) are introduced as constraints in the target function of PARAMAGNETIC-DYANA (36) calculations as a sum of differences between the experimental and the calculated pcs for the observed nuclei in each family of structures according to the previously reported procedure (36, 37). The experimental pseudocontact shifts for <sup>15</sup>N and backbone <sup>1</sup>H atoms of the CaCeCb derivative in the presence of 2 M GdmHCl were obtained from the observed chemical shifts according to the expression

$$\delta^{\text{exp}} = \delta^{\text{dia}} + \delta^{\text{pcs}}$$

where  $\delta^{\text{dia}}$  is the chemical shift of the corresponding nucleus in the Ca<sub>2</sub>Cb native protein in the presence of 2 M GdmHCl. The calculated  $\delta^{\text{pcs}}$  values were obtained by assuming the metal center point dipole approximation, i.e., by applying eq 1 to the corresponding nuclei.

$$\delta_i^{\text{pcs}} = \frac{1}{12\pi r_i^3} \left[ \Delta\chi_{\text{ax}} (3 \cos^2 \theta_i - 1) + \frac{3}{2} \Delta\chi_{\text{rh}} \sin^2 \theta_i \cos 2\phi_i \right] \quad (1)$$

where  $\Delta\chi_{\text{ax}}$  and  $\Delta\chi_{\text{rh}}$  are the axial and rhombic anisotropy parameters, respectively, of the magnetic susceptibility tensor of the metal,  $r_i$  is the distance between atom  $i$  and the metal ion, and  $\theta_i$  and  $\phi_i$  are the spherical polar angles of atom  $i$  with respect to the principal axes of the magnetic susceptibility tensor centered on the metal ion. The magnetic anisotropy components as well as the orientation of the tensor were obtained using the program FANTASIA (38).

### Structure Calculation

The modified version of the program DYANA (39), called PARAMAGNETIC-DYANA (36), which permits the use of pcs as constraints, was used for the structure calculations. Torsion angle dynamics (TAD) combined with a simulated annealing algorithm was used to calculate a family of 200 structures starting from randomly generated conformers in 10 000 annealing steps. The quality of structures calculated by PARAMAGNETIC-DYANA can be assessed by a properly defined function (target function) proportional to the squared deviations of the calculated constraints from the experimental ones, plus the squared van der Waals contact

violations. In DYANA (and in PARAMAGNETIC-DYANA as well), the target function TF has the role of a pseudopotential energy and is defined so that TF = 0 if and only if all experimental distance constraints and torsion angle constraints are fulfilled and all nonbonded atom pairs satisfy a check for the absence of steric overlap (39). TF values are expressed in square angstroms. Mean structures obtained were minimized using the program PARAMAGNETIC-DYANA with a 1000 steps conjugate gradient minimization.

The programs RASMOL and PROCHECK-NMR were subsequently used to analyze the calculated structures.

## RESULTS

**NMR Titration with GdmHCl.** The changes in <sup>1</sup>H and <sup>15</sup>N shift values for the Ca<sub>2</sub>Cb and CaCeCb derivatives were followed by titrating the protein with increasing amounts of GdmHCl and acquiring both 1D <sup>1</sup>H and 2D <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N HSQC spectra after each addition of denaturant to the protein samples.

In the range of GdmHCl concentrations that was used (0–2 M), chemical shift differences for H<sub>N</sub> in either Ca<sub>2</sub>Cb or CaCeCb are small and close to zero; the pattern is the same in both proteins and reproducible. Larger chemical shift changes are observed in CaCeCb in the region of isotropically shifted signals. Overall, observed changes are up to 2 ppm for the hyperfine-shifted signals and up to 0.3 ppm for the diamagnetic signals.

Differences in chemical shifts of <sup>15</sup>N resonances are bigger, some of them more than 1 ppm. As previously reported (40, 41), these differences are likely correlated to some charge-dependent mechanism. No concomitant decrease in intensity of any HSQC peak was observed. The very small chemical shift differences and the lack of intensity changes indicate that, at 2 M GdmHCl, the overall folding of CaCeCb is conserved, and that no exchange equilibrium is present between two or more species.

To acquire information about protein stability, we titrated the nonlabeled CaCeCb protein to a guanidinium chloride concentration of 5.5 M. No exchange phenomena and no loss of secondary structure were observed, in agreement with data reported in the literature, indicating that the metal-containing protein is very resistant to denaturation (11). This structural stability prevents us from performing a two-state model fitting (native-unfolded) (42) as used in previous works (23, 43, 44) to obtain the free energy of unfolding in the absence of denaturant ( $\Delta G^\circ$ ). On the contrary, when the titration was performed on the apo form of the protein, loss of secondary structure was observed for a denaturing concentration of 3.3 M, consistent with previous findings.

**Fast Protein Dynamics via Cross Correlation Experiments.** Fast protein dynamics are usually evaluated via the rather tedious and experimentally time-consuming so-called ModelFree approach (45–47). However, it has been pointed out by Bax *et al.* (33) that much simpler relaxation interference experiments between <sup>15</sup>N chemical shift anisotropy (CSA) and <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N dipole–dipole coupling give equivalent information about the order parameters ( $S^2$ ) with a precision of 5–10%. We have performed such cross correlation experiments on the Ca<sub>2</sub>Cb sample at 2 M GdmHCl, and compared the results with those obtained at 0 M GdmHCl (48).

Measured cross correlation rates (ccr hereafter) range from 4.6 to 10.2 s<sup>−1</sup> and from 4.6 to 13.4 s<sup>−1</sup> at 0 and 2 M

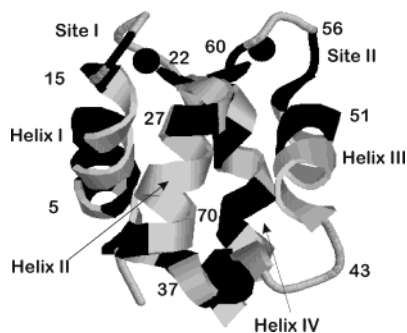


FIGURE 1: Schematic drawing of Ca<sub>2</sub>Cb. Residues shown in dark gray correspond to those backbone atoms for which a decrease in cross correlation rates larger than  $0.6 \text{ s}^{-1}$  was measured when passing from 0 to 2 M GdmHCl.

GdmHCl, respectively (Supporting Information, Table S1). Although, on average, <sup>15</sup>N CSA and dipole–dipole ccr show an only 5% decrease on passing from 0 to 2 M GdmHCl, there are amino acids that experience a variation of up to 25%.

Residues whose cross correlation rates decrease by more than  $0.6 \text{ s}^{-1}$  on passing from 0 to 2 M GdmHCl are shown in dark gray in Figure 1. As found for the native state of the protein (48), rates smaller than the average are observed in the linker region and are indicative of fast internal dynamics. Under non-native conditions, the four helices show a much larger spreading and slightly smaller rates with respect to the native state. Within each EF-hand, the two helices exhibit a different behavior, helices I and IV being much more affected by the presence of GdmHCl than helices II and III. Also, the two metal binding domains do not behave in the same way. Indeed, the regular EF-hand loop (site II) appears to be much more affected by GdmHCl than the pseudo-EF-hand (site I).

The behavior of hydrophobic core residues is significant. The hydrophobic core is formed by packing of hydrophobic side chains belonging to the four helices as well as to the two binding loops. Structural studies point out that hydrophobic core is formed by the following residues: Leu6, Ile9, Phe10, Leu23, Leu28, Leu31, Leu32, Leu46, Leu49, Phe50, Leu53, Val61, Phe66, Leu69, Val70, and Ile73 (7). Some of the hydrophobic residues that belong to helix IV experience a substantial decrease in ccr with respect to that under native conditions. In sites I and II, residues Leu23 and Val61, which also belong to the hydrophobic core of the protein and are part of the antiparallel  $\beta$ -strand region forming a two-way interdomain H-bond, exhibit lower rates. This provides spectroscopic evidence that the H-bond between the two residues is broken, thus allowing less restricted internal motions for Leu23 and Val61.

Finally, there are residues that exhibit an increase in ccr upon addition of GdmHCl. In particular, residues Asp19, Glu27, Glu48, Ser62, and Val68 experience an increase in their rates of more than  $0.7 \text{ s}^{-1}$ .

*Slow Protein Dynamics As Measured via T<sub>2</sub> CPMG Experiments.* Protein motions on the microsecond to millisecond time scales are normally due to chemical or conformational kinetic phenomena (49, 50). Such exchange processes contribute to the transverse relaxation rate and can be quantified by <sup>15</sup>N NMR relaxation measurements for the amide backbone resonances using CPMG (laboratory frame) T<sub>2</sub> experiments at variable  $\tau_{\text{cp}}$  (32, 50). <sup>15</sup>N  $R_2(1/\tau_{\text{cp}})$  values

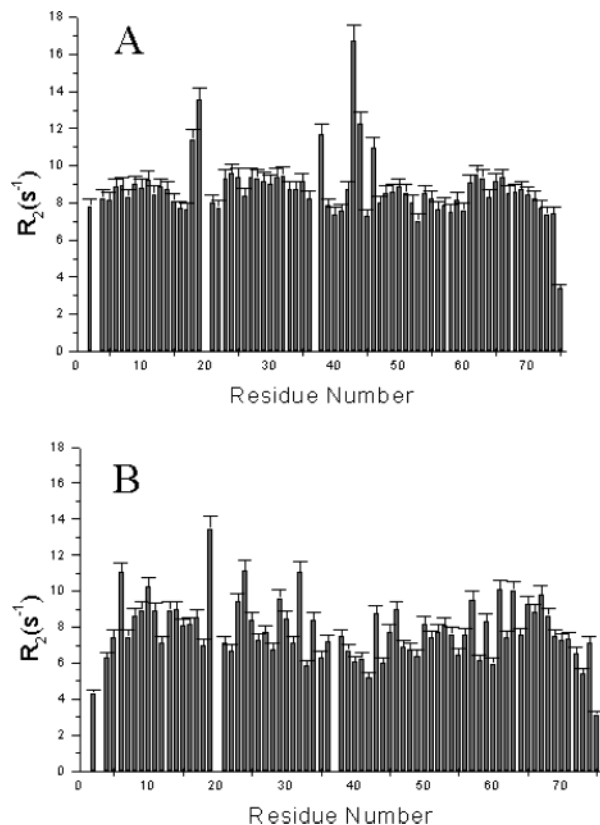


FIGURE 2: Comparison of  $R_2$  values measured for Ca<sub>2</sub>Cb at 0 (48) (A) and 2 M GdmHCl (B). Values were collected at 700 MHz, using the relaxation-compensated T<sub>2</sub> CPMG sequence (32) with a  $\tau_{\text{cp}}$  of 1 ms.

were measured on the Ca<sub>2</sub>Cb form of the protein in the presence of 2 M GdmHCl. A lack of observable dispersion was observed in plots of  $R_2$  versus  $1/\tau_{\text{cp}}$  over the experimentally accessible range in the protein (data not shown).

$R_2$  values obtained with a  $\tau_{\text{cp}}$  of 1 ms can be compared with data previously collected on the native form of the protein (48). Two main features are observed as shown in Figure 2. (i) An exchange contribution to  $R_2$ , observed in the native form for residues 18, 38, 43, 44, and 46, is not present at 2 M GdmHCl. (ii) The behavior of  $R_2$  values versus the amino acidic sequence is very similar to that observed for cross correlation rates. In particular, residues belonging to the hydrophobic core of the protein are almost unaffected by the presence of GdmHCl, while solvent-exposed ones experience increases in  $R_2$  values.

*Amide Proton Exchange Rates.* Conformational exchange phenomena which open parts of the protein backbone and expose it to bulk solvent are expected to give rise to relatively fast amide proton exchange kinetics for the exposed residues. Amide proton exchange in the range from  $0.1$  to  $90 \text{ s}^{-1}$  is easily assessed via (CLEANEX-PM)—HSQC experiments (34, 35). We have acquired the <sup>15</sup>N (CLEANEX-PM)—FSQC spectrum for the Ca<sub>2</sub>Cb sample at 2 M GdmHCl. The spectrum is the same as that obtained without denaturant (48).

*Pseudocontact Shifts.* From the analysis of chemical shift values obtained for both Ca<sub>2</sub>Cb and CaCeCb at 0 and 2 M GdmHCl, slight changes in pcs for both <sup>15</sup>N and H<sub>N</sub> resonances have been observed. In particular, residues in sites I and II endure the largest changes, as shown in Figure 3. The general trend is the same at both concentrations of the



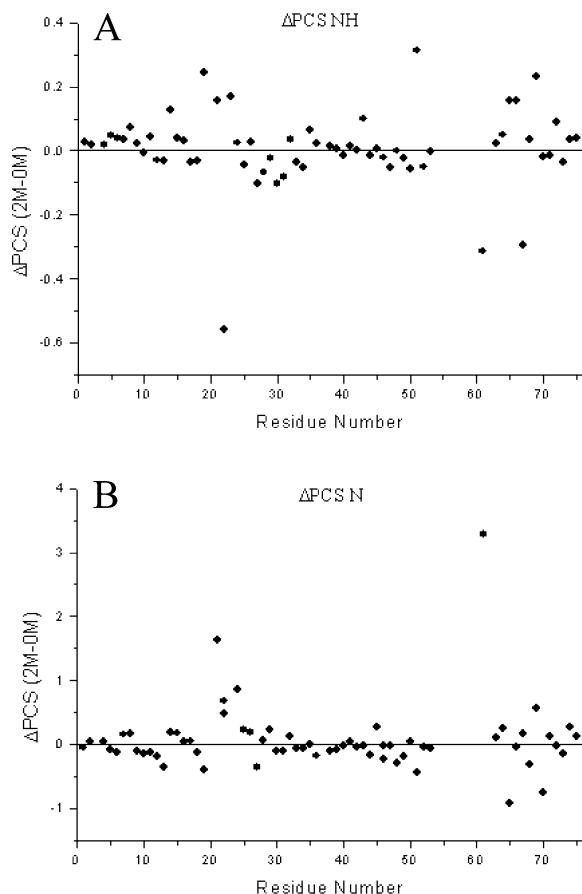


FIGURE 3: Observed differences between pseudocontact shifts measured at 2 and 0 M GdmHCl for the CaCeCb derivative. Values are reported for HN (A) and N (B) backbone resonances. All reported values are reported according to the equation  $\Delta\delta = [\delta(\text{Ce}, 2 \text{ M}) - \delta(\text{Ca}, 2 \text{ M})] - [\delta(\text{Ce}, 0 \text{ M}) - \delta(\text{Ca}, 0 \text{ M})]$ .

denaturant, but there are nine residues, namely, residues 19 and 21–24 (site I) and 61 and 64 (site II), which, together with residues 69 and 70, which belong to the C-terminus of the protein, present quite different values of pcs due to the presence of GdmHCl.

Pcs values obtained at 2 M GdmHCl are used to recalculate the orientation of the magnetic axes and the magnitude of the main components of the magnetic susceptibility tensor for the CaCeCb derivative by running the program FANTASIA (38). The values obtained in the present work are as follows:  $\Delta\chi_{\text{ax}} = 2.20 \times 10^{-32} \text{ m}^3$  and  $\Delta\chi_{\text{rh}} = 0.60 \times 10^{-32} \text{ m}^3$ . They are very similar to those of the native state:  $\Delta\chi_{\text{ax}} = 2.08 \times 10^{-32} \text{ m}^3$  and  $\Delta\chi_{\text{rh}} = 0.71 \times 10^{-32} \text{ m}^3$  (6).

**Solution Structure Calculations.** Structure calculations were performed with the program PARAMAGNETIC-DYANA (36). The structure [PDB entry 1N65 (51)] consists of four helices and three loops, of which the first and third constitute the metal-binding site. Such an ensemble of conformers has a root-mean-square deviation (rmsd) for the backbone atoms of  $0.71 \pm 0.23 \text{ \AA}$ . The target function obtained for this family of structures ranges from 1.10 to  $1.15 \text{ \AA}^2$ . Most of the contributions to target function arise from pcs constraints (87%), and no consistent violations between NOESY constraints were found.

Even if more than 1000 NOESY constraints from the native form of the protein were used, the obtained structure is different from that of the native state. The structure of the

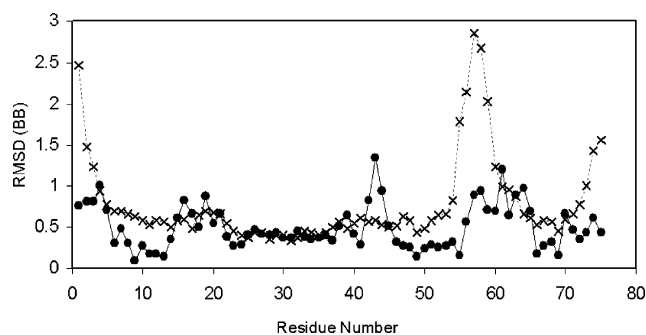


FIGURE 4: Pairwise rmsd (●) between the CaCeCb structure obtained at 0 M GdmHCl and the CaCeCb structure obtained at 2 M GdmHCl. The two structures were obtained using the same set of NOE values and a different set of pseudocontact shifts and magnetic anisotropy tensor. The sum of rmsd values obtained for the two structures is also shown (×). The latter is used as a threshold to monitor those regions in which observed structural differences are meaningful.

native protein, obtained with the same NOESY constraints and pcs values at 0 M GdmHCl, has a backbone rmsd of  $0.67 \pm 0.22$ , while the target function ranges from  $0.64$  to  $0.71 \text{ \AA}^2$ . The rmsd for the backbone atoms of native and non-native states is  $0.48 \text{ \AA}$ , and the rmsd (BB) plot per residue between the native and unfolded structure is given in Figure 4 (●). Secondary structure elements and the overall four-helix bundle fold are not affected by the mild denaturant concentration; nevertheless, both metal binding loops and the linker region do experience structural variations.

## DISCUSSION

The body of the experimental NMR data acquired for the Ca<sub>2</sub>Cb and CaCeCb derivatives under non-native conditions provides a complete picture of the structural and dynamical features of this system and may contribute to a more complete understanding of the folding properties of Calbindin D<sub>9k</sub>. Extensive studies have been performed in the past on the WT protein and on various mutants in an effort to obtain information about its stability and function (11, 30, 52).

All the previous studies have shown that reduction of the stability of the hydrophobic core is not sufficient in itself to induce the opening of the protein core even under very strong denaturing conditions. Therefore, large alterations in stability seem to be tolerated by the protein while it retains its fold and conformational response to calcium binding. It has been shown that the CaCeCb protein is stable at high denaturant concentrations while Calbindin D<sub>9k</sub> loses its structure at relatively low denaturant concentrations when no metal is coordinated. This permits us to state that not only Ca<sup>2+</sup> but also Ce<sup>3+</sup> contribute to the protein stability.

The analysis of fast protein dynamics at 0 and 2 M GdmHCl measured on the diamagnetic Ca<sub>2</sub>Cb indicates that the outer residues of the helices do experience a reduction in the cross correlation rates while the hydrophobic part of the helices is almost unaltered. This supports the picture that hydrophobic interactions occurring between the helices are the driving force of the four-helix bundle fold. An interesting result is the increase in ccr rates for residues 19, 27, 43, 48, 62, and 68. All of them, with the notable exception of residue 19, whose backbone carbonyl is coordinating the calcium ion, are close in sequence to residues belonging to the hydrophobic core of the protein. Their non-negligible

increased rigidity at 2 M GdmHCl can be therefore related to a closer and stronger packing of the hydrophobic interactions in the protein as a response to the presence of denaturing agents in solution.

The different topology between EF-hand and pseudo-EF-hand loops provides them with different properties. This was previously pointed out by dynamics and mutagenesis studies (11, 30, 52), and it is remarkable that under non-native conditions this feature becomes more evident. At 2 M GdmHCl, site I retains in an unaltered form the dynamic properties of the native state, with the exception of residue 19 that experiences an increased rigidity. This suggests that backbone dynamics are essentially driven by the binding of the metal ion and that mild concentrations of the denaturant have only small effects on the affinity of pseudo-EF-hand versus Ca<sup>2+</sup>. On the other hand, site II experiences a more generalized decrease in ccr rates. Indeed, when the metal coordination is mostly provided by carboxylate groups of side chains such as in the classical EF-hand site II of Cb, the backbone dynamics of the metal binding loop are expected to be less hindered by the metal ion, much less dependent on the chromophore, and therefore much more dependent on the solution environment.

The behavior of hydrophobic residues is also interesting. Indeed, not all the hydrophobic core residues are equally affected by the addition of denaturing agents. While for residues belonging to helices I–III the observed differences in cross correlation rates between 0 and 2 M GdmHCl are, on average, zero, the hydrophobic residues of helix IV, namely, residues 66, 69, 70, and 73, do experience lower rates at 2 M GdmHCl. Previously observed differences between the structures of apo Cb and Ca<sub>2</sub>Cb in helix IV have been associated with a subtle reorganization of the hydrophobic core (53). These data agree with our findings and point out that the hydrophobic core region around helix IV constitutes a sort of weak part in the hydrophobic core of the protein.

The observed decrease in cross correlation rates of the two residues involved in a two-way long-range H-bond (namely, residues 23 and 61) suggests that, even at low concentrations of GdmHCl, there can be subtle structural variations in the relative position of the two protein subdomains. The increased dynamics of Leu23 and Val61 are likely to cause the disruption of such an H-bond bridge which, in turn, has an important role in the relative position of the two EF-hand domains. Such changes in cross correlation rates may be precipitated by structural effects, as shown by the comparison of structures in solution in native and non-native states.

*T*<sub>2</sub> CPMG experiments further contribute to the understanding of the behavior of the system under non-native conditions. On one hand, the absence of any dependence of *T*<sub>2</sub> values on the  $\tau_{cp}$  delay is consistent with the results obtained for Ca<sub>2</sub>Cb in the native form (48). On the other hand, *T*<sub>2</sub> values collected using a  $\tau_{cp}$  of 1 ms at 0 and 2 M GdmHCl indicate that the exchange contribution (millisecond dynamics) observed in the native protein for some residues of the hydrophobic pocket is not present at 2 M GdmHCl. In particular, only residue 19 retains the exchange contribution to *T*<sub>2</sub><sup>-1</sup> found for the native form of the protein. Slow dynamics observed in the native state have been related to a redirection of the Met43 side chain to the protein core inducing conformational exchange in residues belonging to

the hydrophobic core of the protein (48). Mild charged denaturing agents are likely to freeze the conformational exchange of the Met43 hydrophobic side chain as well as that of residues 18, 38, 44, and 46, which are involved in this rearrangement. This is in perfect agreement with the fast protein dynamics findings, since ccr values indicate that Met43 has a more restricted motion at 2 M GdmHCl, suggesting a complete redirection of its side chain toward the protein core.

To address structural changes at 2 M GdmHCl, we focused on the information arising from the hyperfine interaction. The availability of pcs data makes it possible to recalculate the structure simply using the NOEs collected on the native state of the protein together with pcs data collected at 2 M GdmHCl. The absence of consistent violations between NOESY constraints as well as the rmsd observed between the two structures (native and non-native) indicates that early steps of the unfolding produce small structural rearrangements that do not affect the NOESY constraints, probably because they are within the tolerance of these constraints. Still, such rearrangements can be monitored by pcs constraints, and the observed structural differences between the native form and the 2 M GdmHCl state can be safely analyzed. The same approach has recently been used to monitor temperature-dependent structural changes. Different sets of pcs collected at different temperatures in the range of 280–310 K were used together with a single set of NOE data, collected at 300 K, to monitor temperature-dependent structural changes (54).

Figure 4 reports the rmsd per residue observed between the structure recalculated at 2 M GdmHCl and the structure of the native form. The overall rmsd between the native and non-native state (0.48 Å) is much smaller than those observed in other early steps of unfolding processes. The rmsd values below 1.0 Å are also observed among structures of the same protein obtained with a different set of constraints (e.g., without pcs, rdc, or both) (44). The rmsd values around 0.3 Å are usually observed between different X-ray structures of the same protein obtained in different crystal forms (55). Therefore, the observed rmsd value is indicative of very subtle structural changes and is somewhat at the borderline of significance. Still, the observed differences are localized well and therefore point out those protein regions that undergo structural rearrangements upon interaction with GdmHCl. There are three regions where the rmsd between the two average structures is significantly larger than the sum of the rmsd values of the two families, which is also shown in Figure 4 and which can be safely considered the threshold for discrimination of structural changes. Three residues for each of the metal binding sites and for the linker region are, together with residue 39, which is also close to the linker region, above the sum of the rmsd values of the two families. This indicates that the two domains undergo some change in their relative orientation. In the family of structures obtained under non-native conditions, only three of 20 conformers retain the two-way H-bond between Leu23 and Val61. The observed structural change of this H-bond, which in the native state forms the only interdomain contact in the entire protein, supports the rearrangement supposed from the fast dynamics results. This rearrangement may also affect the overall shape of the protein as can be observed from the small change in the magnetic anisotropy tensor obtained from

pcs values. Consistent with the different topology of the two metal binding domains, site II, which binds the metal via side chains, exhibits on average larger structural rearrangements than the more rigid site I. It is the linker region, and in particular residue Met43, that undergoes the larger structural changes when passing from the native state to 2 M GdmHCl. As suggested by the analysis of dynamics data, this can be explained by supposing a complete reorientation of the hydrophobic Met43 side chain toward the protein core to minimize the interaction with the charged denaturing agent present in solution.

Given the high stability of both Ca<sub>2</sub>Cb and CaCeCb, a GdmHCl concentration of 2 M is not sufficient to change the overall fold of the system. Since only very small chemical shift differences and no intensity change in <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N HSQC peaks were observed, no exchange phenomena are present between two or more forms of the protein. The protein is basically in a near-native state very close in energy, structure, and mobility to the native one. In terms of energy landscape (25, 56), the near-native state at 2 M GdmHCl corresponds to a conformation that differs from the native one for the fraction of native contacts ( $Q_0$ ), and therefore for the total free energy. This conformation is found near the bottom of the “funnel-like” shape that defines the accessible free energy surface of the protein, but does not correspond to the unique (lowest-energy) native conformation. These results are similar to those obtained for cytochrome *b*<sub>5</sub> in the presence of a low GdmHCl concentration (23).

**Concluding Remarks.** Even when kinetic aspects of folding and unfolding processes are neglected, it is very difficult not only to characterize but also to identify the occurrence of structural and/or dynamics perturbations arising from the presence of non-native conditions. For several years, NMR spectroscopy has been considered the best technique for monitoring the occurrence of those non-native states (19, 57–59), yet how sensitive NMR can be is, of course, a difficult question to address.

In the case of Calbindin D<sub>9k</sub>, our results point out that, even at a mild concentration of a denaturing agent (2 M GdmHCl) and although no major changes occur in terms of the overall molecular fold, there are several events that can be monitored. Hydrophobic and hydrophilic residues of the four-helix bundle domain undergo different changes in local dynamics, showing a somehow tighter packing of the hydrophobic core of the protein. Within the hydrophobic core, residues belonging to helix IV are much more affected than residues arising from helices I–III by changes in the solution environment. A complete reorientation of the Met43 side chain toward the hydrophobic core is accomplished by the disappearance of the millisecond dynamics observed on the native form of Calbindin. The two metal binding domains have a different behavior under mild denaturing conditions, consistent with their topology. The addition of 2 M GdmHCl to Ca<sub>2</sub>Cb and CeCaCb gives access to a near-native state of the protein. Both the structure and dynamics of this near-native state can be characterized with the same precision of the native state. The exploitation of long-range paramagnetism-based constraints available for the CaCeCb derivative allows us to monitor the subtle structural changes in the interdomain orientation occurring in Calbindin D<sub>9k</sub> at 2 M GdmHCl without any need for additional NOESY experiments and assignments. Information derived from the

analysis of pseudocontact shifts allows us to monitor the small variation in the magnetic anisotropy tensor and to recalculate a structure in solution that allows a fine mapping of structural events under non-native conditions.

In conclusion, it is well established that paramagnetic probes provide precious structural information. The results presented here point out that another feature of paramagnetism-based constraints is sensitivity. This, in our opinion, is going to be extremely useful and widely exploited in the next future. Whenever applicable, this approach promises to be a key to improving the ability of NMR spectroscopy to address small fluctuation and local conformational changes.

## ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Prof. Ivano Bertini and Prof. Claudio Luchinat for their advice and discussions.

## SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Cross correlation rates measured for Ca<sub>2</sub>Cb at 0 and 2 M GdmHCl. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## REFERENCES

1. Heizmann, C. W., and Hunziker, W. (1991) *Trends Biochem. Sci.* 16, 98–103.
2. Kretsinger, R. H., and Nockolds, C. E. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 3313–3326.
3. Allegrozzi, M., Bertini, I., Janik, M. B. L., Lee, Y.-M., Liu, G., and Luchinat, C. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* 122, 4154–4161.
4. Banci, L., Bertini, I., and Luchinat, C. (1985) in *Rare Earths Spectroscopy* (Trebatowska, B. J., Legendziewicz, J., and Streck, W., Eds.) pp 80–99, World Scientific, Singapore.
5. Bentrop, D., Bertini, I., Cremonini, M. A., Forsén, S., Luchinat, C., and Malmendal, A. (1997) *Biochemistry* 36, 11605–11618.
6. Bertini, I., Janik, M. B. L., Lee, Y.-M., Luchinat, C., and Rosato, A. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* 123, 4181–4188.
7. Svensson, L. A., Thulin, E., and Forsén, S. (1992) *J. Mol. Biol.* 223, 601–606.
8. Kordel, J., Skelton, N. J., and Chazin, W. J. (1993) *J. Mol. Biol.* 231, 711–734.
9. Bertini, I., Donaire, A., Jimenez, B., Luchinat, C., Parigi, G., Piccioli, M., and Poggi, L. (2001) *J. Biomol. NMR* 21, 85–98.
10. Bertini, I., Lee, Y.-M., Luchinat, C., Piccioli, M., and Poggi, L. (2001) *ChemBioChem* 2, 550–558.
11. Julenius, K., Thulin, E., Linse, S., and Finn, B. E. (1998) *Biochemistry* 37, 8915–8925.
12. Akke, M., and Forsén, S. (1990) *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 8, 23–29.
13. Wendt, B., Hofmann, T., Martin, S. R., Bayley, P. M., Brodin, P., Grundstrom, T., Thulin, E., Linse, S., and Forsén, S. (1988) *Eur. J. Biochem.* 175, 439–445.
14. Finn, B. E., Kordel, J., Thulin, E., Sellers, P., and Forsén, S. (1992) *FEBS Lett.* 298, 211–214.
15. Dill, K. A., and Shortle, D. (1991) *Annu. Rev. Biochem.* 60, 795–825.
16. Shortle, D. (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 24–30.
17. Smith, L. J., Bolin, K. A., Schwalbe, H., MacArthur, M. W., Thornton, J. M., and Dobson, C. M. (1998) *Folding Des. I*, R95–R106.
18. Neri, D., Billeter, M., Wider, G., and Wüthrich, K. (1992) *Science* 257, 1559–1563.
19. Buck, M., Schwalbe, H., and Dobson, C. M. (1995) *Biochemistry* 34, 13219–13232.
20. Logan, T. M., Theriault, Y., and Fesik, S. W. (1994) *J. Mol. Biol.* 236, 637–648.
21. Farrow, N. A., Zhang, O., Forman-Kay, J. D., and Kay, L. E. (1997) *Biochemistry* 36, 2390–2402.
22. Zhang, O., Kay, L. E., Shortle, D., and Forman-Kay, J. D. (1997) *J. Mol. Biol.* 272, 9–20.
23. Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., and Koulougliotis, D. (1998) *Biochemistry* 37, 17082–17092.

24. Bentrop, D., Bertini, I., Iacoviello, R., Luchinat, C., Niikura, Y., Piccioli, M., Presenti, C., and Rosato, A. (1999) *Biochemistry* 38, 4669–4680.
25. Dobson, C. M., and Karplus, M. (1999) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 92–101.
26. Schwalbe, H., Grimshaw, S. B., Spencer, A., Buck, M., Boyd, J., Dobson, C. M., Redfield, C., and Smith, L. J. (2001) *Protein Sci.* 10, 677–688.
27. Wain, R., Pertinhez, T. A., Tomlinson, E. J., Hong, L., Dobson, C. M., Ferguson, S. J., and Smith, L. J. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 45813–45817.
28. Brodin, P., Grundstrom, T., Hofmann, T., Drakenberg, T., Thulin, E., and Forsén, S. (1986) *Biochemistry* 25, 5371–5377.
29. Johansson, C., Brodin, P., Grundstrom, T., Thulin, E., Forsén, S., and Drakenberg, T. (1990) *Eur. J. Biochem.* 187, 455–460.
30. Malmendal, A., Carlström, G., Hambræus, C., Drakenberg, T., Forsén, S., and Akke, M. (1998) *Biochemistry* 37, 2586–2595.
31. Chazin, W. J., Kördel, J., Drakenberg, T., Thulin, E., Brodin, P., Grundstrom, T., and Forsén, S. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 2195–2198.
32. Millet, O., Loria, J. P., Kroenke, C. D., Pons, M., and Palmer, A. G., III (2000) *J. Am. Chem. Soc.* 122, 2867–2877.
33. Tjandra, N., Szabo, A., and Bax, A. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* 118, 6986–6991.
34. Hwang, T. L., Mori, S., Shaka, A. J., and Van Zijl, P. C. M. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* 119, 6203–6204.
35. Hwang, T. L., Van Zijl, P. C. M., and Mori, S. (1998) *J. Biomol. NMR* 11, 221–226.
36. Barbieri, R., Bertini, I., Cavallaro, G., Lee, Y. M., Luchinat, C., and Rosato, A. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124, 5581–5587.
37. Banci, L., Bertini, I., Cremonini, M. A., Gori Savellini, G., Luchinat, C., Wüthrich, K., and Güntert, P. (1998) *J. Biomol. NMR* 12, 553–557.
38. Banci, L., Bertini, I., Gori Savellini, G., Romagnoli, A., Turano, P., Cremonini, M. A., Luchinat, C., and Gray, H. B. (1997) *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 29, 68–76.
39. Güntert, P., Mumenthaler, C., and Wüthrich, K. (1997) *J. Mol. Biol.* 273, 283–298.
40. Bertini, I., Luchinat, C., and Turano, P. (2000) *J. Biol. Inorg. Chem.* 5, 761–764.
41. Boyd, J., Dobson, C. M., Morar, A. S., Williams, R. J. P., and Pielak, G. J. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* 121, 9247–9248.
42. Santoro, M. M., and Bolen, D. W. (1988) *Biochemistry* 27, 8063–8068.
43. Bertini, I., Cowan, J. A., Luchinat, C., Natarajan, K., and Piccioli, M. (1997) *Biochemistry* 36, 9332–9339.
44. Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Koulougliotis, D., and Monti, A. (2000) *Biochemistry* 39, 7117–7130.
45. Halle, B., and Wennerström, H. (1981) *J. Chem. Phys.* 75, 1928–1943.
46. Lipari, G., and Szabo, A. (1982) *J. Am. Chem. Soc.* 104, 4559–4570.
47. Lipari, G., and Szabo, A. (1982) *J. Am. Chem. Soc.* 104, 4546–4559.
48. Bertini, I., Carrano, C. J., Luchinat, C., Piccioli, M., and Poggi, L. (2002) *Biochemistry* 41, 5104–5111.
49. Kay, L. E. (1998) *Nat. Struct. Biol.* 5, 513–517.
50. Ishima, R., and Torchia, D. A. (2000) *Nat. Struct. Biol.* 7, 740–743.
51. Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., and Bourne, P. E. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28, 235–242.
52. Kragelund, B. B., Jönsson, M., Bifulco, G., Chazin, W. J., Nilsson, A., Finn, B. E., and Linse, S. (1998) *Biochemistry* 37, 8926–8937.
53. Skelton, N. J., Kordel, J., and Chazin, W. J. (1995) *J. Mol. Biol.* 249, 441–462.
54. Allegrozzi, M., Bertini, I., Choi, S. N., Lee, Y.-M., and Luchinat, C. (2002) *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2121–2127.
55. Gallagher, T., Alexander, P., and Gilliland, G. L. (1994) *Biochemistry* 33, 4721–4729.
56. Dobson, C. M., Sali, A., and Karplus, M. (1998) *Angew. Chem., Int. Ed.* 37, 868–893.
57. Balbach, J., Forge, V., Van Nuland, N. A. J., Winder, S. L., Hore, P. J., and Dobson, C. M. (1995) *Nat. Struct. Biol.* 2, 865–870.
58. Miranker, A., Radford, S. E., Karplus, M., and Dobson, C. M. (1991) *Nature* 349, 633–635.
59. Wain, R., Pertinhez, T. A., Tomlinson, E. J., Hong, L., Dobson, C. M., Ferguson, S. J., and Smith, L. J. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 45813–45817.

BI034638+

## **PRINCIPLES AND PRACTICE**

---

**Springer**

*Berlin*

*Heidelberg*

*New York*

*Hong Kong*

*London*

*Milan*

*Paris*

*Tokyo*

Roza Maria Kamp  
Juan J. Calvete  
Theodora Choli-Papadopoulou (Eds.)

---

# Methods in Proteome and Protein Analysis

With 144 Figures, 19 in Color



Springer

Professor DR. ROZA MARIA KAMP  
Technische Fachhochschule Berlin  
Seestraße 65  
13347 Berlin  
Germany  
*email:* kamp@tfh-berlin.de

Dr. JUAN J. CALVETE  
Instituto de Biomedicina de Valencia, C.S.I.C.  
Jaime Roig 11  
46010 Valencia  
Spain  
*email:* jcalvete@ibv.csic.es

Ass. Prof. Dr. THEODORA CHOLI-PAPADOPOULOU  
Aristotle University of Thessaloniki  
School of Chemistry, Laboratory of Biochemistry  
Thessaloniki 54006  
Greece  
*email:* TCHOLI@CHEM.AUTH.GR

---

Selected papers presented at the 14th meeting on Methods in Protein Structural Analysis (MPSA),  
September 2002, Valencia, Spain

---

ISBN 3-540-20222-6 Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

Library of Congress Cataloging-in-Publication Data.

Methods in proteome and protein analysis / Roza Maria Kamp, Juan J. Calvete, Theodore  
Choli-Papadopoulou (Eds).  
p. cm. -- (Principles and practice)  
Includes bibliographical references and index.  
ISBN 3-540-20222-6 (alk. paper)  
1. Proteins--Analysis--Congresses. 2. Proteomics--Congresses. I. Kamp, R. M. (Roza  
Maria), 1951- II. Calvete, Juan J. III. Choli-Papadopoulou, T. (Theodora), 1956- IV.  
Series.

QP551.M399 2004  
572'.6--dc22

2003066408

This work is subject to copyright. All rights are reserved, whether the whole or part of the material is concerned, specifically the rights of translation, reprinting, reuse of illustrations, recitation, broadcasting, reproduction on microfilm or in any other way, and storage in data banks. Duplication of this publication or parts thereof is permitted only under the provisions of the German Copyright Law of September 9, 1965, in its current version, and permissions for use must always be obtained from Springer-Verlag. Violations are liable for prosecution under the German Copyright Law.

Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York  
Springer-Verlag is a part of Springer Science+Business Media  
springeronline.com

© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2004

Printed in Germany

The use of general descriptive names, registered names, trademarks, etc. in this publication does not imply, even in the absence of a specific statement, that such names are exempt from the relevant protective laws and regulations and therefore free for general use.

Production and typesetting: Friedmut Kröner, 69115 Heidelberg, Germany  
Cover design: *design & production* GmbH, Heidelberg

31/3150 YK - 5 4 3 2 1 0 - Printed on acid free paper



## Preface

The 14th meeting on Methods in Protein Structural Analysis (MPSA) was held in Valencia (Spain) September 8–12, 2002. Approximately 200 researchers from more than two dozen countries, representing both the academic and the industrial worlds, attended the conference. The MPSA meetings began in 1974 as a small workshop organized with the aim of exchanging information on newly developed instruments and chemistry for N-terminal sequencing of polypeptides. Since then, MPSA conferences are held every two years, usually alternating between both sides of the Atlantic Ocean. Starting with the 13th conference (Charlottesville, USA, 2000), the biennial MPSA meetings are now sponsored by the International Association of Protein Structure Analysis and Proteomics (IAPSAP), a non-profit organization established in 1999 to promote the discovery and exchange of new methods and techniques for the analysis of protein structures [1]. With the “omics” revolutions in the so-called post-genomic era, the scope of the MPSA conferences has also expanded from protein sequence analysis to proteome (and protein) structure analyses. Thus, major topics of MPSA2002 included different experimental approaches (X-ray crystallography, mass spectrometry, cryo-electron microscopy, tomography) for studying very large multi-subunit molecular nanomachines; international initiatives committed to developing high-throughput methods for large-scale protein expression and purification, sample preparation, and automatic data acquisition for structure determination by both X-ray diffraction and NMR spectroscopy; mechanisms of protein folding and misfolding *in vitro* and *in vivo*; protein–protein interactions; analysis of post-translational modifications; and the classification, structure prediction, and evolution of protein folds and functions [2]. MPSA2002 program and abstracts are available on the meeting website (<http://www.mpsa2002.ibv.csic.es>). This book, which contains contributions presented by speakers and papers selected from poster presentations, is published with the aim to inspire new ideas for the advancement of the rapidly growing field of protein science. I am glad to note the significant contribution of Spanish (senior and young) researchers, which reflects the scientific level reached in a country where less than 1 % of its annual budget is invested in research.

As President of the Organizing Committee of MPSA2002, I wish to express special thanks to my colleagues of the Scientific Program Committee, Ettore Appella, Carl W. Anderson, and Jay W. Fox, who devoted much time to the organization of the scientific program that made MPSA2002 a very exciting meeting. The many corporate sponsors and institutions that contributed both economically and scientifically to the success of the conference are also gratefully acknowledged.

JUAN J. CALVETE

Valencia, March 2003

- [1] Apella, E., Fox, J.W. & Anderson, C.W. (2001) Meeting Report. *Protein Sci.* 10, 459–461
- [2] Anderson, C.W., Calvete, J.J., Fox, J.W. & Appella, E. (2003) Meeting Report. *Protein Sci.* 12, 398–400

# Contents

<b>1</b>	<b>Helix-Helix Packing Between Transmembrane Fragments</b> . . . . .	<b>1</b>
	MAR ORZÁEZ, FRANCISCO J. TABERNER, ENRIQUE PÉREZ-PAYÁ, ISMAEL MINGARRO	
	Abstract . . . . .	1
1.1	Introduction . . . . .	2
1.2	Glycophorin A as a Model System . . . . .	3
1.3	Influence of the Distance Between the Dimerisation Motif and the Flanking Charged Residues on the Packing Process Between TM Helices . . . . .	5
1.4	Length of the Hydrophobic Fragment and Oligomerisation Prozesse . . . . .	6
1.5	Prolines in Transmembrane Helix Packing . . . . .	8
1.6	Future Prospects for Membrane Protein Analysis . . . . .	11
	References . . . . .	12
<b>2</b>	<b>Mobility Studies in Proteins by <sup>15</sup>N Nuclear Magnetic Resonance: Rusticyanin as an Example</b> . . . . .	<b>15</b>
	BEATRIZ JIMÉNEZ, JOSÉ MARÍA MORATAL, MARIO PICCIOLI, ANTONIO DONAIRE	
	Abstract . . . . .	15
2.1	Introduction . . . . .	15
2.1.1	NMR Versus X-Ray for the Acquisition of Dynamic Information . . . . .	16
2.1.2	Dynamics of Proteins and NMR . . . . .	17
2.1.2.1	Theoretical Considerations . . . . .	17
2.1.2.2	A Quantitative Analysis of the Model-Free Approach . . . . .	19
2.1.2.3	Practical Aspects . . . . .	21
2.1.3	The System: Rusticyanin . . . . .	23

2.2	Results and Discussion . . . . .	24
2.2.1	Relaxation Properties of Rusticyanin . . . . .	24
2.2.1.1	Relaxation Data . . . . .	24
2.2.1.2	An Analysis of the Generalized Order Parameter in Rc . . . . .	26
2.2.2	D <sub>2</sub> O/H <sub>2</sub> O Exchange Experiments . . . . .	27
2.2.3	Dynamics, Hydration, and Rusticyanin Stability . . . . .	27
2.2.4	Mobility, Hydrophobicity, and High Redox Potential . . . . .	29
2.3	Conclusions . . . . .	30
	References . . . . .	30
3	<b>Structure and Dynamics of Proteins in Crowded Media: A Time-Resolved Fluorescence Polarization Study . . . . .</b>	<b>35</b>
	SILVIA ZORRILLA, GERMAN RIVAS, MARIA PILAR LILLO	
3.1	Macromolecular Crowding in Physiological Media . . . . .	35
3.1.1	Effect of Macromolecular Crowding on Chemical Equilibrium of Macromolecular Association Reactions . . . . .	36
3.1.2	Experimental Approaches to the Study of the Effect of Macromolecular Crowding Upon Biochemical Reactions . . . . .	36
3.2	Application of Time-Resolved Fluorescence Polarization Spectroscopy in Crowded Media . . . . .	37
3.3	Volume Fraction and Intermolecular Separations in a Heterogeneous System . . . . .	39
3.3.1	Characterization of the Crowded Medium Itself . . . . .	39
3.3.2	Microscopic Model for Crowded Solutions . . . . .	39
3.4	Structure and Dynamics of apoMb Dimer in Crowded Protein Solutions . . . . .	41
3.4.1	Preparation of Apomyoglobin and Labelling with ANS . . . . .	42
3.4.2	Spectroscopic Properties of ANS Remain Essentially Unchanged Upon Dimer Formation . . . . .	42
3.4.3	Conformational Dynamics of the Dimer of Apomyoglobin . . . . .	44
3.5	Conclusions and Outlook . . . . .	46
	References . . . . .	47
4	<b>Analyses of Wheat Seed Proteome: Exploring Protein–Protein Interactions by Manipulating Genome Composition . . . . .</b>	<b>48</b>
	NAZRUL ISLAMAND, HISASHI HIRANO	
4.1	Summary . . . . .	49
4.2	Introduction . . . . .	49

4.3	Techniques of Protein–Protein Interactions . . . . .	50
4.4	Chromosome Manipulation: An Alternative Approach . . .	51
4.4.1	Principle . . . . .	51
4.4.2	Experimentation . . . . .	52
4.4.2.1	Plant Materials . . . . .	52
4.4.2.2	Two-Dimensional Electrophoresis . . . . .	53
4.4.2.3	Quantitative Analysis of Electrophoresis Patterns . . . . .	54
4.4.2.4	Statistical Analysis . . . . .	54
4.4.2.5	Sample Preparation for ICAT-ESI . . . . .	54
4.4.2.6	Protein Analysis by ESI-MS/MS . . . . .	55
4.4.3	Results and Discussion . . . . .	55
4.4.3.1	Localization of Structural Genes . . . . .	55
4.4.3.2	Exploring Protein–Protein Interactions . . . . .	58
4.5	Concluding Remarks . . . . .	64
	References . . . . .	64

**5 Modification-Specific Proteomic Strategy  
for Identification of Glycosyl-Phosphatidylinositol  
Anchored Membrane Proteins . . . . . 67**  
 FELIX ELORTZA, LEONARD J. FOSTER,  
 ALLAN STENSBALLE, OLE N. JENSEN

5.1	Summary . . . . .	67
5.2	Introduction . . . . .	68
5.2.1	Glycosyl-Phosphatidylinositol Anchored Proteins . . . . .	68
5.3	Results . . . . .	71
5.3.1	Selective Isolation of GPI-Anchored Proteins . . . . .	71
5.3.2	Identification of GPI-Anchored Proteins by Mass Spectrometry . . . . .	72
5.3.3	Protein Sequence Analysis . . . . .	73
5.4	Discussion . . . . .	73
5.5	Conclusion . . . . .	75
5.6	Material and Methods . . . . .	76
5.6.1	Lipid Raft Preparation . . . . .	76
5.6.2	Two-Phase Separation and Phosphoinositol-Phospholipase C Treatment . . . . .	76
5.6.3	Mass Spectrometry . . . . .	76
5.6.4	Bioinformatics . . . . .	77
	References . . . . .	77

<b>6</b>	<b>Diocleinae Lectins: Clues to Delineate Structure/ Function Correlations</b> . . . . .	81
	FRANCISCA GALLEGRO DEL SOL, VANIA M. CECCATTO, CELSO S. NAGANO, FREDERICO B.M.B. MORENO, ALEXANDRE H. SAMPAIO, THALLES B. GRANGEIRO, BENILDO S. CAVADA, JUAN J. CALVETE	
6.1	Introduction . . . . .	81
6.2	Quaternary Structure Variability . . . . .	82
6.3	Structural Basis of pH-Dependent Oligomerisation: The Crystal Structures of the Lectins from <i>Dioclea grandiflora</i> and <i>Dioclea guianensis</i> . . . . .	83
6.3.1	The Key Role of His-131: The Crystal Structure of <i>Dioclea violacea</i> (Dviol) Seed Lectin . . . . .	85
6.4	Diocleinae Lectin Sequence Characteristics as Phylogenetic Markers . . . . .	89
	References . . . . .	90
<b>7</b>	<b>The Contribution of Optical Biosensors to the Analysis of Structure-Function Relationships in Proteins</b> .	93
	MARC H.V, VAN REGENMORTEL	
7.1	Introduction . . . . .	93
7.2	Structures Do Not Cause Function . . . . .	94
7.3	Can Protein Functions Be Predicted from Structure or Should They Be Determined Experimentally? . . . . .	95
7.4	Analysing Structure-Activity Correlations with Biosensors .	96
	References . . . . .	100
<b>8</b>	<b>The Use of Protein-Protein Interaction Networks for Genome-Wide Protein Function Comparisons and Predictions</b> . . . . .	103
	CHRISTINE BRUN, ANAÏS BAUDOT, ALAIN GUÉNOCHE, BERNARD JACQ	
	Abstract . . . . .	103
8.1	Introduction . . . . .	104
8.2	How is Protein Function Defined and Represented? . . . . .	105
8.2.1	The Problem of Function Description . . . . .	105
8.2.2	Attempts Towards Textual Descriptions of Function . . . . .	106
8.2.3	Present Limitations of Functional Descriptions and New Research Directions . . . . .	108

8.3 A Protein Network-Based Approach of the Study of Function . . . . . 109

8.3.1 Molecular Interactions and Genetic Networks . . . . . 109

8.3.2 Protein-Protein Interaction Data Acquisition, Protein Interaction Databases and Maps . . . . . 110

8.3.3 Protein Networks Studies Allow Us to Revisit the Notion of Function . . . . . 110

8.4 Functional Clustering of Proteins Based on Interactions . . 112

8.4.1 Principle . . . . . 112

8.4.2 Functional Classification of 10 % of the Yeast Proteome . . . 114

8.4.3 The Different Types of Functional Clusters . . . . . 116

8.4.4 Application to Another Proteome: *Helicobacter pylori* . . . . 117

8.5 Protein-Protein Interactions and Structural Biology . . . . 118

8.6 Conclusion . . . . . 120

References . . . . . 121

**9 Probing Ribosomal Proteins Capable of Interacting with Polyamines . . . . . 125**  
 DIMITRIOS L. KALPAXIS, MARIA A. XAPLANTERI,  
 IOANNIS AMARANTOS, FOTINI LEONTIADOU,  
 THEODORA CHOLI-PAPADOPOULOU

9.1 Introduction . . . . . 125

9.2 Fixation of Polyamines to Ribosomal Proteins with Homobifunctional Cross-Linkers . . . . . 126

9.3 Labeling of Ribosomal Proteins with Photoreactive Spermine Analogues . . . . . 127

9.4 Functional Implications and Perspectives . . . . . 128

References . . . . . 130

**10 Applications of Optical Biosensors to Structure-Function Studies on the EGF/EGF Receptor System . . . . . 133**  
 EDOUARD C. NICE, BRUNO CATIMEL, JULIE A. ROTHACKER,  
 NATHAN HALL, ANTONY W. BURGESS, THOMAS P. J. GARRETT,  
 NEIL M. MCKERN , COLIN W. WARD

10.1 Introduction . . . . . 133

10.2 The EGF/EGFR Family . . . . . 134

10.3 Biosensor Analysis . . . . . 136

10.3.1 Instrumentation . . . . . 136

10.3.2 Generation of an Active Biosensor Surface . . . . . 139

10.3.3	Kinetic Analysis . . . . .	139
10.3.4	Solution Competition Analysis Using Biosensors . . . . .	140
10.4	Biosensor Analysis of the Interactions Between EGF and the EGFR . . . . .	140
10.4.1	Immobilisation Strategies for EGF . . . . .	140
10.4.2	Immobilisation Strategies for sEGFR . . . . .	142
10.4.3	Kinetic Analysis of the Interaction Between hEGF and the Soluble Extracellular Domain of the EGF Receptor (sEGFR 1–621) . . . . .	143
10.4.4	Confirmation of the Binding Model . . . . .	145
10.4.5	Identification of a Truncated High Affinity Form of the Soluble Extracellular Domain of the EGF Receptor . . . . .	147
10.4.6	Kinetic Analysis of the Interaction Between EGF and sEGFR 1–501 . . . . .	148
10.4.7	Analysis of the Receptor/Ligand Interaction Using Immobilised Receptor . . . . .	149
10.4.8	sEGFR 1–501 and sEGFR 1–621 are Competitive Inhibitors of EGF Induced Mitogenesis . . . . .	150
10.4.9	Identification of a Determinant of EGF Receptor Ligand Binding Specificity (Chickenising the Human EGF Receptor) . . . . .	151
10.5	Structural Studies on the EGF Receptor Family . . . . .	152
10.5.1	Inactivated EGFR Adopts an Autoinhibited Configuration . . . . .	154
10.6.	Regulation of Homo- and Heterodimerisation . . . . .	154
10.7	Rationalisation of the Structural and Biosensor Data . . . . .	156
10.8	Conclusion . . . . .	157
	References . . . . .	158
<b>11</b>	<b>The Functional Interaction Trap: A Novel Strategy to Study Specific Protein–Protein Interactions . . . . .</b>	<b>165</b>
	ALOK SHARMA, SUSUMU ANTOKU, BRUCE J. MAYER	
11.1	Protein–Protein Interactions in Cellular Systems . . . . .	165
11.2	Signal Transduction . . . . .	165
11.3	Tyrosine Phosphorylation and the Identification of Physiologically Relevant Substrates . . . . .	167
11.4	The Functional Interaction Trap as a Novel Strategy to Promote Specific Protein–Protein Interactions and Post-Translational Modifications . . . . .	169
11.4.1	Coiled-Coil Segments Can Act as a Specific Artificial Binding Interface Between the Abl Tyrosine Kinase and Substrates . . . . .	170



11.4.2	Coiled-Coil Segments can Activate Physiological Downstream Signaling Events . . . . .	173
11.4.3	Implications of FIT for Analysis of the Functional Consequences of Specific Tyrosine Phosphorylation . . . . .	174
11.5	Broader Uses of the FIT Strategy . . . . .	176
11.6	Advantages and Disadvantages of FIT . . . . .	178
11.7	Concluding Remarks . . . . .	179
	References . . . . .	180
12	<b>Analysis of Protein-Protein Interactions in Complex Biological Samples by MALDI TOF MS. Feasibility and Use of the Intensity-Fading (IF-) Approach . . . . .</b>	<b>183</b>
	JOSEP VILLANUEVA, OSCAR YANES, ENRIQUE QUEROL, LUIS SERRANO AND FRANCESC X. AVILÉS	
12.1	Introduction . . . . .	183
12.1.1	Mass Spectrometry as a Modern Approach to Study Protein-Protein and Protein-Ligand Interactions . . . . .	183
12.1.2	Characterization of Non-Covalent Interactions Using ESI . . . . .	184
12.1.3	Characterization of Non-Covalent Interactions Using MALDI . . . . .	184
12.1.3.1	MALDI-Based Indirect Methods . . . . .	184
12,1,3,2	MALDI-Based Direct Methods . . . . .	185
12.1.3.3	The Intensity-Fading (IF) MALDI-T of Approach . . . . .	186
12.2	Experimental Procedures . . . . .	186
12.2.1	Biomolecule Interaction Experiments . . . . .	186
12.2.1.1	General Sample Preparation . . . . .	186
12.2.1.2	Protease-Inhibitor Interaction . . . . .	187
12.2.2	MALDI-TOF Mass Spectrometry . . . . .	187
12.2.2.1	Preparation of Samples for MALDI-TOF Mass Spectrometry . . . . .	187
12.2.2.2	MALDI-TOF Matrix Preparation . . . . .	188
12.2.2.3	Sample-Matrix Preparation . . . . .	188
12.3	Results and Discussion . . . . .	188
12.3.1	Basis for the Detection of Non-Covalent Complexes by MALDI-TOF MS . . . . .	188
12.3.2	Suggested Mechanism for “Intensity Fading” (IF-) in MALDI-MS . . . . .	189
12.3.3	Semiquantitative Determination of the Affinities Between the Interacting Partners . . . . .	190
12.3.4	Detection of Protein Ligands in Complex Samples . . . . .	192
12.3.4.1	Ion Suppression Effects in MALDI-TOF MS, and Sample Preparation for Complex Biological Samples . . . . .	192

12.3.4.2	Leech Saliva IF MALDI-TOF Analysis . . . . .	194
12.3.4.3	Sea Anemone Extract IF MALDI-TOF Analysis . . . . .	196
12.3.4.3.1	Trypsin as the target molecule . . . . .	196
12.3.4.3.2	Carboxypeptidase A as the Target Molecule . . . . .	197
12.4	General Discussion . . . . .	199
	References . . . . .	200
13	<b>Accelerator Mass Spectrometry in Protein Analysis . . . . .</b>	<b>203</b>
	JOHN S. VOGEL, DARREN J. HILLEGONDS, MAGNUS PALMBLAD, PATRICK G. GRANT, GRAHAM BENCH	
13.1	Introduction . . . . .	203
13.2	Accelerator Mass Spectrometry . . . . .	205
13.3	Biomolecular Targets of Labeled Compounds . . . . .	207
13.4	Specific Binding Affinity . . . . .	209
13.5	Attomole Edman Sequencing . . . . .	211
13.6	Conclusion . . . . .	214
	References . . . . .	214
14	<b>The Use of Microcalorimetric Techniques to Study the Structure and Function of the Transferrin Receptor from <i>Neisseria meningitidis</i> . . . . .</b>	<b>217</b>
	TINO KRELL, GENEVIÈVE RENAULD-MONGÉNIE	
14.1	Introduction . . . . .	217
14.2	Microcalorimetric Titrations of Individual TbpA, TbpB and the Meningococcal Receptor Complex with Human Iron-Free (apo) and Iron-Loaded (holo) Transferrin	220
14.2.1	Binding of Transferrin to TbpA . . . . .	220
14.2.2	Binding of Transferrin to TbpB . . . . .	222
14.2.3	Binding of Transferrin to the Receptor Complex (TbpA+TbpB) . . . . .	222
14.2.4	Conclusions Concerning the Structure and Function of the Receptor . . . . .	223
14.3	Generation of Recombinant N- and C-Terminal Domains of TbpB and the Study of Their Interaction . . . . .	224
14.3.1	Isothermal Titration Calorimetry (ITC) Binding Studies . . . . .	224
14.3.1.1	Calorimetric Titrations of TbpB, N-ter and C-ter with holo-htf . . . . .	224
14.3.1.2	Calorimetric Titration of the N-terminal Domain of TbpB with its C-Terminal Domain . . . . .	225

14.3.2 Thermal Denaturation Studies Monitored  
by Differential Scanning Calorimetry (DSC) . . . . . 227

14.3.3 Circular Dichroism Spectroscopy . . . . . 228

14.3.4 Conclusions Concerning the Structure of TbpB . . . . . 229

References . . . . . 229

**15 The Quantitative Advantages of an Internal Standard  
in Multiplexing 2D Electrophoresis . . . . . 231**  
JOHN PRIME, ANDREW ALBAN, EDWARD HAWKINS, BARRY HUGHES

15.1 Introduction . . . . . 231

15.2 Materials and Methods . . . . . 234

15.2.1 Sample Preparation and Labelling . . . . . 234

15.2.2 CyDye Pre-Labeling of Protein Samples  
for the Ettan DIGE System . . . . . 236

15.2.3 2-D Gel Electrophoresis . . . . . 236

15.2.4 Image Acquisition of Ettan DIGE System Gels . . . . . 237

15.2.5 SYPRO Ruby Post-Staining of Conventional 2-DE Gels . . . 237

15.3 Results . . . . . 237

15.3.1 Ettan DIGE System Analysis . . . . . 238

15.3.2 Image Analysis of Conventional ‘One Sample  
Per Gel’ SYPRO Ruby Stained Gels with Progenesis . . . . . 242

15.3.3 Comparison of Quantitative Proteome Analysis Results  
Between the Two Systems . . . . . 245

15.3.3.1 BSA . . . . . 245

15.3.3.2 Conalbumin . . . . . 246

15.3.3.3 GAPDH . . . . . 246

15.3.3.4 Trypsin Inhibitor . . . . . 247

15.4 Conclusions . . . . . 247

References . . . . . 249

**16 Genetic Engineering of Bacterial and Eukaryotic  
Ribosomal Proteins for Investigation on Elongation  
Arrest of Nascent Polypeptides and Cell Differentiation . . 251**  
FOTINI LEONTIADOU, CHRISTINA MATRAGOU, PHILIPPOS  
KOTAKIS, DIMITRIOS L. KALPAKIS, IOANIS VIZIRIANAKIS,  
SOFIA KOUIDOU, ASTERIOS TSIFSOGLOU,  
THEODORA CHOLI-PAPADOPOULOU

16.1 Introduction . . . . . 251

16.2 The Involvement of L4 Ribosomal Protein  
on Ribosome Elongation Arrest . . . . . 252

16.3	Down-Regulation of rpS5 and rpL35a Gene Expression During Murine Erythroleukemia (MEL) Cell Differentiation: Implications for Cell Differentiation and Apoptosis . . . . .	255
	References . . . . .	257
17	<b>MALDI-MS Analysis of Peptides Modified with Photolabile Arylazido Groups . . . . .</b>	261
	WILLIAM LOW, JAMES KANG, MICHEAL DIGRUCCIO, DEAN KIRBY, MARILYN PERRIN, and WOLFGANG H. FISCHER	
	Abstract . . . . .	261
17.1	Introduction . . . . .	261
17.2	Results and Discussion . . . . .	262
17.3	Experimental Procedures . . . . .	267
17.3.1	Azidobenzoylation of Astressin . . . . .	267
17.3.2	V8 Peptidase Digestion of Modified Peptides . . . . .	267
17.3.3	MALDI-MS Analysis . . . . .	268
17.3.4	UV Spectra . . . . .	268
	References . . . . .	268
18	<b>A New Edman-Type Reagent for High Sensitive Protein Sequencing . . . . .</b>	269
	CHRISTIAN WURZEL, BARBARA ZU LYNAR, CHRISTOPH RADCKE, RALF KRÜGER, MICHAEL KARAS, BRIGITTE WITTMANN-LIEBOLD	
	Abstract . . . . .	269
18.1	Introduction . . . . .	270
18.2	Materials and Methods . . . . .	271
18.3	Results . . . . .	271
18.3.1	Chip-Sequencer . . . . .	271
18.3.2	Evaluation of 1,3-bis-(Trifluoromethyl)-Phenylisothiocyanate as a New Coupling Reagent in Edman Chemistry . . . . .	272
18.3.3	High Sensitive Detection of Thiohydantoin Derivatives . . . . .	273
18.4	Discussion and Outlook . . . . .	277
	References . . . . .	278

<b>19</b>	<b>Amino Acid Sequencing of Sulfonic Acid-Labeled Tryptic Peptides Using Post-Source Decay and Quadratic Field MALDI-ToF Mass Spectrometry . . . .</b>	<b>279</b>
	RAMA BHIKHABHAI, MATTIAS ALGOTSSON, ULRIKA CARLSSON, JOHN FLENSBURG, LENA HÖRNSTEN, CAMILLA LARSSON, JEAN-LUC MALOISEL, RONNIE PALMGREN, MARI-ANN PESULA, MARIA LIMINGA	
Abstract . . . . .		279
19.1 Introduction . . . . .		279
19.2 Material and Methods . . . . .		280
19.2.1 Chemicals . . . . .		280
19.2.2 CAF Labeling Protocol . . . . .		281
19.2.3 Analysis of Peptides by MALDI-ToF Mass Spectrometry . .		281
19.2.4 Interpretation of Spectra . . . . .		281
19.2.5 Protein Identification . . . . .		282
19.2.6 Analysis of Synthetic Phosphopeptides . . . . .		282
19.3 Results and Discussion . . . . .		282
19.3.1 Sequencing of a Synthetic Peptide . . . . .		283
19.4 Identification/Confirmation of Recombinant Protein . . . .		284
19.4.1 Sensitivity . . . . .		286
19.4.2 Sequencing of Phosphopeptides . . . . .		292
19.4.2.1 Identification of Phosphopeptide . . . . .		293
19.5 Conclusions . . . . .		296
References . . . . .		297
<b>20</b>	<b>Separation of Peptides and Amino Acids using High Performance Capillary Electrophoresis . . . . .</b>	<b>299</b>
	HONG JIN, ROZA MARIA KAMP	
20.1 Introduction . . . . .		299
20.2 Separation of Peptides . . . . .		301
20.2.1 Trypsin Cleavage . . . . .		301
20.2.1.1 Digestion of $\beta$ -Lactoglobulin . . . . .		301
20.2.1.2 Trypsin Digestion of Cytochrome C . . . . .		301
20.2.2 Separation Conditions for HPCE . . . . .		301
20.2.2.1 Separation of $\beta$ -Lactoglobulin Tryptic Peptides . . . . .		301
20.2.2.2 Separation of Cytochrome C After Trypsin Digestion . . . .		302
20.3 Sequencing of Proteins and PTH Amino Acid Analysis . . .		303
20.3.1 Chemicals . . . . .		304
20.3.2 Amino Acid Standard Preparation . . . . .		304
20.3.3 Sequencing of Bradykinin . . . . .		304

20.3.4	HPCE Separation Conditions for PTH Amino Acid . . . . .	305
20.3.5	Optimization of the PTH Amino Acid Separation . . . . .	305
20.4	Conclusion . . . . .	305
References	. . . . .	306

<b>21</b>	<b>Interpro and Proteome Analysis – <i>In silico</i> Analysis of Proteins and Proteomes . . . . .</b>	<b>307</b>
	NICOLA JANE MULDER, MANUELA PRUESS, ROLF APWEILER	

21.1	Introduction . . . . .	307
21.2	Protein Analysis Tools . . . . .	308
21.2.1	InterPro . . . . .	308
21.2.1.1	Content and Features . . . . .	308
21.2.1.2	Searching InterPro . . . . .	310
21.2.1.3	Applications . . . . .	310
21.2.2	Proteome Analysis . . . . .	312
21.2.2.1	Content and Features . . . . .	312
21.2.2.2	Statistical Analysis . . . . .	314
21.2.2.3	Applications . . . . .	315
21.3	Discussion . . . . .	315
References	. . . . .	316

<b>22</b>	<b>Prediction of Functional Sites in Proteins by Evolutionary Methods . . . . .</b>	<b>319</b>
	PEDRO LÓPEZ-ROMERO, MANUEL J. GÓMEZ, PAULINO GÓMEZ-PUERTAS, ALFONSO VALENCIA	

Abstract	. . . . .	319
22.1	Protein Function and Amino Acids Involved . . . . .	319
22.2	Interaction Sites and Their Structural and Chemical Properties . . . . .	320
22.3	Functional Role of Conserved Residues in Multiple Sequence Alignments . . . . .	320
22.4	Why Predicting Functional Sites? . . . . .	321
22.5	The Use of Sequence Information for the Prediction of Functional Sites . . . . .	322
23.6	Methods for Predicting Tree-Determinant Residues . . . . .	324
23.7	Methods for Predicting Functional Sites Based on Structural Information . . . . .	327

23.8	Comparisons Between Methods . . . . .	328
22.9	Main Problems in the Characterization of Tree-Determinant Residues . . . . .	331
22.10	The Use of Information on Tree-Determinant Residues in Molecular Biology . . . . .	333
	References . . . . .	336
23	<b>Extracting and Searching for Structural Information: A Multiresolution Approach . . . . .</b>	<b>341</b>
	NATALIA JIMÉNEZ-LOZANO, MÓNICA CHAGOYEN, PEDRO ANTONIO DE-ALARCÓN, JOSÉ MARÍA CARAZO	
23.1	From Protein to Function . . . . .	341
23.2	Structural Feature Relevance in Macromolecular Complexes	343
23.3	Extraction and Characterisation of Structural Features . . .	344
23.4	FEMME Database: Feature Extraction in a Multi-Resolution Macromolecular Environment . . . . .	348
23.5	One of the FEMME Utilities: Query by Content . . . . .	352
23.6	Conclusions . . . . .	354
	References . . . . .	355
24	<b>Peak Erazor: A Windows-Based Programme for Improving Peptide Mass Searches . . . . .</b>	<b>359</b>
	KARIN HJERNØ, PETER HØJRUP	
24.1	Introduction . . . . .	359
24.2	Program Layout . . . . .	360
24.2.1	Erazor List . . . . .	360
24.2.2	Peak List . . . . .	362
24.2.3	Background . . . . .	363
24.2.4	Evaluate . . . . .	363
24.3	Calibrating for Peptide Mass Fingerprinting . . . . .	363
24.4	Mapping Peptide Masses in Known Proteins . . . . .	365
24.5	Identifying Background Peaks . . . . .	366
24.6	Evaluation: Extracting Information on Common Contaminants . . . . .	366
24.7	Discussion . . . . .	368
	References . . . . .	369

<b>25</b>	<b>Increasing Throughput and Data Quality for Proteomics . . .</b>	<b>371</b>
	ALFRED L. GAERTNER, NICOLE L. CHOW, BETH G. FRYKSDALE, PAUL JEDRZEJEWSKI, BRIAN S. MILLER, SIGRID PAECH, DAVID L. WONG	
Abstract . . . . .		371
25.1	Introduction . . . . .	372
25.1.1	Prefractionation by Membrane Devices . . . . .	372
25.1.2	Fractionation of a Fungal Exoproteome . . . . .	373
25.1.3	Mass Spectrometry Identification After Prefractionation . . .	376
25.2	Deglycosylation as a Means for Improved Protein Identification . . . . .	377
25.2.1	Deglycosylation of a Fungal Proteome . . . . .	378
25.2.2	Deglycosylation Summary . . . . .	380
25.3	High-throughput Proteomics Method Optimization . . . . .	381
25.3.1	Method Development to Increase Sample Consistency . . .	383
25.3.2	Method Optimization and Results . . . . .	384
25.3.2.1	Digestion Buffers . . . . .	384
25.3.2.2	Extraction Buffers . . . . .	386
25.3.2.3	Matrix Spotting Methods . . . . .	389
25.3.3	High-throughput Proteomics (ProGest) Optimization . . . .	390
25.3.4	Conclusions . . . . .	390
25.4	Protein Identification and Quantification using N <sup>14</sup> /N <sup>15</sup> Isotopic Labeling Technique . . . . .	391
25.4.1	Identification and Quantification Technique . . . . .	392
25.4.2	Conclusion . . . . .	396
References . . . . .		396
<b>Subject Index . . . . .</b>		<b>399</b>



# Contributors

ALBAN, ANDREW

Amersham Biosciences UK Limited, The Grove Centre, White Lion Road,  
Amersham, Buckinghamshire, HP7 9LL, UK

ALGOTSSON, MATTIAS

Amersham Biosciences AB, Björkgatan 30, 751 84, Uppsala, Sweden

AMARANTOS, IOANNIS

University of Patras, School of Medicine, Laboratory of Biochemistry,  
26500 Patras, Greece

ANTOKU, SUSUMU

Department of Genetics and Developmental Biology, University of  
Connecticut Health Science Center, 263 Farmington Avenue, Farmington,  
Connecticut 06030-3301, USA

APWEILER, ROLF

The EMBL Outstation, European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust  
Genome Campus, Hinxton, Cambridge, CB10 1SD, UK

AVILÉS, FRANCESC X.

(e-mail: fxaviles@einstein.uab.es, Tel.: +34-93-5811315,

Fax: +34-93-5812011)

Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, and Departament de  
Bioquímica, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra,  
Barcelona, Spain

BAUDOT, ANAÏS

Laboratoire de Génétique et Physiologie du Développement, Institut de  
Biologie du Développement de Marseille, Marseille, France

XXII Contributors

BENCH, GRAHAM

Center for Accelerator Mass Spectrometry, Lawrence Livermore National Laboratory; Livermore, California 94551, USA

BHIKHABHAI, RAMA

(e-mail: rama.bhikhabhai@amersham.com,  
Tel.: +46-18-6120000, Fax: +46-18-6121844)  
Amersham Biosciences AB, Björkgatan 30, 751 84, Uppsala, Sweden

BRUN, CHRISTINE

Laboratoire de Génétique et Physiologie du Développement, Institut de Biologie du Développement de Marseille, Marseille, France

BURGESS, ANTONY W.

The Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne Tumour Biology Branch, P.O. Royal Melbourne Hospital, Parkville, Victoria 30501, Australia, and The CRC for Cellular Growth Factors, Parkville, Victoria, Australia

CALVETE, JUAN J.

(e-mail: jcalvete@ibv.csic.es); Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC, Jaime Roig 11, 46010 Valencia, Spain

CARAZO, JOSÉ MARÍA

Centro Nacional de Biotecnología, Campus Universidad Autónoma, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

CARLSSON, ULRIKA

Amersham Biosciences AB, Björkgatan 30, 751 84, Uppsala, Sweden

CATIMEL, BRUNO

The Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne Tumour Biology Branch, P.O. Royal Melbourne Hospital, Parkville, Victoria 30501, Australia

CAVADA, BENILDO S.

BioMol-Lab, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Ceará, Fortaleza, Brasil

CECCATTO, VANIA M.

BioMol-Lab, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Ceará, Fortaleza, Brasil

CHAGOYEN, MÓNICA

Centro Nacional de Biotecnología, Campus Universidad Autónoma,  
Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

CHOLI-PAPADOPOULOU, THEODORA

(e-mail: tcholi@chem.auth.gr, Tel.: +30-23-10997806,

Fax: +30-23-10997689)

Laboratory of Biochemistry, School of Chemistry, Aristotle University of  
Thessaloniki, 54124 Thessaloniki, Greece

CHOW, NICOLE L.

Genencor International Inc., 925 Page Mill Road ,Palo Alto,  
California 94304, USA

DE-ALARCÓN, PEDRO ANTONIO

Centro Nacional de Biotecnología, Campus Universidad Autónoma,  
Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

DEL SOL, FRANCISCA

Gallego Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC, Jaime Roig 11, 46010  
Valencia, Spain

DIGRUCCIO, MICHEAL

The Salk Institute, 10010 N. Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037,  
USA

DONAIRE, ANTONIO

(e-mail: adonaire@umh.es, Tel.: +34-96-6658942, Fax: +34-96-6658758)

Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández,  
Edificio Torregaitán, Avda. Ferrocarril s/n, 03202-Elche, Alicante, Spain

ELORTZA, FELIX

Protein Research Group, Department of Biochemistry and Molecular  
Biology, University of Southern Denmark, 5230 Odense M, Denmark

FISCHER, WOLFGANG H.

(e-mail: Fischer@salk.edu, Tel.: +85-84-53 4100)

The Salk Institute, 10010 N. Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037,  
USA

FLENSBURG, JOHN

Amersham Biosciences AB, Björkgatan 30, 751 84, Uppsala, Sweden

XXIV Contributors

FOSTER, LEONARD J.

Protein Research Group, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, 5230 Odense M, Denmark

FRYKSDALE, BETH G.

Genencor International, Inc., 925 Page Mill Road ,Palo Alto, California 94304, USA

GAERTNER, ALFRED L.

(e-mail: agaertner@genecot.com)

Genencor International, Inc., 925 Page Mill Road ,Palo Alto, California 94304, USA

GARRETT, THOMAS P.J.

The CRC for Cellular Growth Factors, Parkville, Victoria, Australia, andThe Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Parkville, Victoria, Australia

GÓMEZ, MANUEL J.

(e-mail: mjgommo@cnb.uam.es)

Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Campus UAM, Cantoblanco 28049 Madrid, Spain

GÓMEZ-PUERTAS, PAULINO

(e-mail: pagomez@cnb.uam.es)

Centro de Astrobiología, CSIC-INTA. Ctra. Torrejón – Ajalvir, Km 4. Torrejón de Ardoz, 28850 Madrid, Spain

GRANGEIRO, THALLES B.

Departamento de Biologia, Universidade Federal de Ceará, Fortaleza, Brasil

GRANT, PATRICK G.

Center for Accelerator Mass Spectrometry, Lawrence Livermore National Laboratory; Livermore, California 94551, USA

GUÉNOCHE, ALAIN

Institut de Mathématiques de Luminy, Parc Scientifique de Luminy, Case 907, 13288 Marseille Cedex 9, France

HALL, NATHAN

The Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne Tumour Biology Branch, P.O. Royal Melbourne Hospital, Parkville, Victoria 30501 Australia, and The CRC for Cellular Growth Factors, Parkville, Victoria, Australia

HAWKINS, EDWARD

(e-mail: edward.hawkins@amersham.com)  
Amersham Biosciences UK Limited, The Grove Centre, White Lion Road, Amersham, Buckinghamshire, HP7 9LL, UK

HILLEGONDS, DARREN J.

Center for Accelerator Mass Spectrometry, Lawrence Livermore National Laboratory; Livermore, California 94551, USA

HIRANO, HISASHI

(e-mail: hirano@yokohama-cu.ac.jp, Tel./Fax: +81-45-8201901)  
Yokohama City University, Maioka-cho 641-12, Totsuka-ku, Yokohama, 2440813, Japan

HJERNØ, KARIN

Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, Campusvej 55, 5230 Odense M, Denmark

HØJRUP, PETER

(e-mail: php@bmb.sdu.dk, Tel.: +45-65-502371, Fax: +45-65-502467)  
Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, Campusvej 55, 5230 Odense M, Denmark

HÖRNSTEN, LENA

Amersham Biosciences AB, Björkgatan 30, 751 84, Uppsala, Sweden

HUGHES, BARRY

Amersham Biosciences UK Limited, The Grove Centre, White Lion Road, Amersham, Buckinghamshire, HP7 9LL, UK

ISLAM, NAZRUL

Yokohama City University, Maioka-cho 641-12, Totsuka-ku, Yokohama, 2440813, Japan

JACQ, BERNARD

(e-mail: jacq@lgpd.univ-mrs.fr)  
Laboratoire de Génétique et Physiologie du Développement, Institut de Biologie du Développement de Marseille, Marseille, France

XXVI Contributors

JEDRZEJEWSKI, PAUL

Genencor International, Inc., 925 Page Mill Road, Palo Alto, California,  
94304, USA

JENSEN, OLE N.

(e-mail: jenseno@bmb.sdu.dk, URL: www.protein.sdu.dk,  
Tel.: +45 -65-502368, Fax: +45-65-502467)  
Protein Research Group, Department of Biochemistry and Molecular  
Biology, University of Southern Denmark, 5230 Odense M, Denmark

JIMÉNEZ, BEATRIZ

Departamento de Química Inorgánica, Universitat de València. C/Dr.  
Moliner, 50, 46100-Burjassot, Valencia, Spain

JIMÉNEZ-LOZANO, NATALIA

Centro Nacional de Biotecnología, Campus Universidad Autónoma,  
Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

JIN, HONG

Department of Biotechnology, University of Applied Sciences, Seestrasse  
64, 13347 Berlin, Germany

KALPAXIS, DIMITRIOS L.

(e-mail: Dimkal@med.upatras.gr, Tel.: +30-26-10996124,  
Fax: +30-26-10997690)  
University of Patras, School of Medicine, Laboratory of Biochemistry,  
26500 Patras, Greece

KAMP, ROZA MARIA

(e-mail: kamp@tfh-berlin.de, Tel.: +49-30-45043923,  
Fax: +49-30-45043959)  
Department of Biotechnology, University of Applied Sciences, Seestrasse  
64, 13347 Berlin, Germany

KANG, JAMES

The Salk Institute, 10010 N. Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037,  
USA

KARAS, MICHAEL

ConSequence GmbH, Potsdamer Strasse 18a, 14513 Teltow, Germany and  
Institute of Pharmaceutical Chemistry, Frankfurt, Germany

KIRBY, DEAN

The Salk Institute, 10010 N. Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037,  
USA

KOTAKIS, PHILIPPOS

Laboratory of Biochemistry, School of Chemistry, Aristotle University of  
Thessaloniki, 54124 Thessaloniki, Greece

KOUIDOU, SOFIA

Laboratory of Biological Chemistry, Department of Medicine, Aristotle  
University of Thessaloniki, 54124 Thessaloniki, Greece

KRELL, TINO

(e-mail: tino.krell@aventis.com, Tel.: +33-43-7379012,  
Fax: +33-43-7373180)  
Aventis Pasteur, 1541 avenue Marcel Mérieux, 69280 Marcy l'Etoile, France

KRÜGER, RALF

Institute of Pharmaceutical Chemistry, Frankfurt, Germany

LARSSON, CAMILLA

Amersham Biosciences AB, Björkgatan 30, 751 84, Uppsala, Sweden

LEONTIADOU, FOTINI

Laboratory of Biochemistry, School of Chemistry, University of  
Thessaloniki, 54006 Thessaloniki, Greece

LILLO, MARIA PILAR

(e-mail: pilar.lillo@iqfr.csic.es, Tel.: +34-91-5619400. Fax: +34-91-5642431)  
Department of Biophysics. Instituto Química Física Rocasolano, IQFR,  
CSIC, Serrano 119, 28006 Madrid, Spain

LIMINGA, MARIA

Amersham Biosciences AB, Björkgatan 30, 751 84, Uppsala, Sweden

LÓPEZ-ROMERO, PEDRO

(e-mail: plromero@cnb.uam.es)  
Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Campus UAM, Cantoblanco  
28049 Madrid, Spain

LOW, WILLIAM

The Salk Institute, 10010 N. Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037,  
USA

XXVIII Contributors

MALOISEL, JEAN-LUC

Amersham Biosciences AB, Björkgatan 30, 751 84, Uppsala, Sweden

MATRAGOÜ, CHRISTINA

Laboratory of Biochemistry, School of Chemistry, Aristotle University of Thessaloniki, 54124 Thessaloniki, Greece

MAYER, BRUCE J.

(e-mail: bmayern@neuron.uchc.edu, Tel.: +86-06-791836,

Fax: t+86-06-798345)

Department of Genetics and Developmental Biology, University of Connecticut Health Science Center, 263 Farmington Avenue, Farmington, Connecticut 06030-3301, USA

McKERN, NEIL M.

The CRC for Cellular Growth Factors, Parkville, Victoria, Australia, and CSIRO Health Sciences and Nutrition, Parkville, Victoria, Australia

MILLER, BRIAN S.

Genencor International, Inc., 925 Page Mill Road, Palo Alto, California 94304, USA

MINGARRO, ISMAEL

(e-mail: Ismael.Mingarro@uv.es, Tel.: +34-96-3543796,

Fax: +34-96-3544635)

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de València, 46 100 Burjassot, Spain

MORATAL, JOSÉ MARÍA

Departamento de Química Inorgánica. Universitat de València. C/Dr. Moliner, 50. 46100-Burjassot, Valencia, Spain

MORENO, FREDERICO B.M.B.

BioMol-Lab, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Ceará, Fortaleza, Brasil

MULDER, NICOLA JANE

(e-mail: mulder@ebi.ac.uk, Tel.: +44-12-23494602, Fax: +44-12-23494468)

The EMBL Outstation, European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, CB10 1SD, UK



NAGANO, CELSO S.

Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal de Ceará,  
Fortaleza, Brasil

NICE, EDOUARD C.

(e-mail: Ed.Nice@ludwig.edu.au, Tel.: + 61-39-3413135,  
Fax: +61-39-3413104)

The Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne Tumour Biology  
Branch, P.O. Royal Melbourne Hospital, Parkville, Victoria 30501, Australia  
and The CRC for Cellular Growth Factors, Parkville, Victoria, Australia

ORZÁEZ, MAR

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de València,  
46 100 Burjassot, Spain

PAECH, SIGRID

Genencor International, Inc., 925 Page Mill Road ,Palo Alto, California  
94304, USA

PALMBLAD, MAGNUS

Center for Accelerator Mass Spectrometry, Lawrence Livermore National  
Laboratory, Livermore, California 94551, USA

PALMGREN, RONNIE

Amersham Biosciences AB, Björkgatan 30, 751 84, Uppsala, Sweden

PÉREZ-PAYÁ, ENRIQUE

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de València,  
46 100 Burjassot, Spain

PERRIN, MARILYN

The Salk Institute, 10010 N. Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037,  
USA

PESULA, MARI-ANN

Amersham Biosciences AB, Björkgatan 30, 751 84, Uppsala, Sweden

PICCIOLI, MARIO

Department of Chemistry and CERM, University of Florence, Via L.  
Sacconi, 6-50019 Sesto, Fiorentino, Italy

XXX Contributors

PRIME, JOHN

Amersham Biosciences UK Limited, The Grove Centre, White Lion Road,  
Amersham, Buckinghamshire, HP7 9LL, UK

PRUESS, MANUELA

The EMBL Outstation, European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust  
Genome Campus, Hinxton, Cambridge, CB10 1SD, UK

QUEROL, ENRIQUE

Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, and Departament de  
Bioquímica, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra,  
Barcelona, Spain

RADCKE, CHRISTOPH

WITA GmbH, Teltow, Germany

RENAULD-MONGÉNIÉ

Geneviève Aventis Pasteur, 1541 avenue Marcel Mérieux, 69280 Marcy  
l'Etoile, France

RIVAS, GERMAN

(e-mail: grivas@cib.es)

Department of Structure and Function of Proteins. Centro de  
Investigaciones Biológicas, CIB, CSIC, Velázquez 144, 28006 Madrid. Spain

ROTHACKER, JULIE A.

The Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne Tumour Biology  
Branch, P.O. Royal Melbourne Hospital, Parkville, Victoria 30501, Australia  
and The CRC for Cellular Growth Factors, Parkville, Victoria, Australia

SAMPAIO, ALEXANDRE H.

Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal de Ceará,  
Fortaleza, Brasil

SERRANO, LUIS

European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Meyerhofstrasse 1,  
69117, Heidelberg, Germany

SHARMA, ALOK

Department of Genetics and Developmental Biology, University of  
Connecticut Health Science Center, 263 Farmington Avenue, Farmington,  
Connecticut 06030-3301, USA

STENSBALLE, ALLAN

Protein Research Group, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, 5230 Odense M, Denmark

TABERNER, FRANCISCO J.

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de València, 46 100 Burjassot, Spain

TSIFSOGLOU, ASTERIOS

Laboratory of Pharmacology, Department of Pharmaceutical Sciences, Aristotle University of Thessaloniki, 54124, Thessaloniki, Greece

VALENCIA, ALFONSO

(e-mail: valencia@cnb.uam.es, Tel.: +34-915854669, Fax: +34-915854506)  
Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Campus UAM, Cantoblanco  
28049 Madrid, Spain

VAN REGENMORTEL, MARC H.V.

(e-mail: vanregen@esbs.u-strasbg.fr, Tel.: +33-39-0244812, Fax: +33-39-0244811)  
Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, UMR 7100, CNRS,  
Boulevard Sébastien Brandt, Illkirch 67400, France

VILLANUEVA, JOSEP

Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, and Departament de Bioquímica, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

VIZIRIANAKIS, IOANIS

Laboratory of Pharmacology, Department of Pharmaceutical Sciences, Aristotle University of Thessaloniki, 54124, Thessaloniki, Greece

VOGEL, JOHN S.

(e-mail: jsvogel@llnl.gov, Tel.: +92-5-4-234232, Fax: +92-5-4237884)  
7000 East Avenue, L-397, Livermore, California 94551, USA

WARD, COLIN W.

The CRC for Cellular Growth Factors, Parkville, Victoria, Australia, and CSIRO Health Sciences and Nutrition, Parkville, Victoria, Australia

XXXII Contributors

WITTMANN-LIEBOLD, BRIGITTE

ConSequence GmbH, Potsdamer Strasse 18a, 14513 Teltow, Germany and  
WITA GmbH, Teltow, Germany

WONG, DAVID L.

Genencor International, Inc., 925 Page Mill Road ,Palo Alto, California  
94304, USA

WURZEL, CHRISTIAN

(e-mail: Wurzel@snafu.de)

ConSequence GmbH, Potsdamer Strasse 18a, 14513 Teltow, Germany

XAPLANTERI, MARIA A.

University of Patras, School of Medicine, Laboratory of Biochemistry,  
26500 Patras, Greece

YANES, OSCAR

Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, and Departament de  
Bioquímica, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra,  
Barcelona, Spain

ZORRILLA, SILVIA

(e-mail: szorrilla@pop3.iib.uam.es, Tel.: +34-91-5619400.

Fax: +34-91-5642431)

Department of Biophysics, Instituto Química Física Rocasolano, IQFR,  
CSIC, Serrano 119, 28006 Madrid, Spain.

ZU LYNAR, BARBARA

ConSequence GmbH, Potsdamer Strasse 18a, 14513 Teltow, Germany

## 2 Mobility Studies in Proteins by $^{15}\text{N}$ Nuclear Magnetic Resonance: Rusticyanin as an Example

BEATRIZ JIMÉNEZ, JOSÉ MARÍA MORATAL, MARIO PICCIOLI  
and ANTONIO DONAIRE

### Abstract

The knowledge of the molecular structure is the first step in comprehending how a protein works. The second level consists of understanding its mobility features. NMR is the only technique that allows the characterization of these two properties. Here, we will describe the relationships between the dynamics of a protein and some Nuclear Magnetic Resonance (NMR) parameters easily achievable, concretely, the  $^{15}\text{N}$  relaxation times ( $T_1$  and  $T_2$ ), and the heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  nuclear Overhauser effect. NMR also allows the detailing of the residues exposed to the solvent, i.e., to identify protein/water interactions. All this information together is essential in describing the functionality of a protein. As an example, we present here a  $^{15}\text{N}$  heteronuclear NMR study on rusticyanin (Rc). Rc possesses a very high redox potential and is very stable at low pH values. Our study reveals that Rc is also very rigid and highly hydrophobic. The present study strongly indicates that both thermodynamic and mobility features of Rc are correlated.

### 2.1 Introduction

Structure-function relationships are one of the main topics in biochemical related sciences. The characterization of the global and local tridimensional structure of a biomolecule is the first crucial step in order to understand its behavior. On one hand, protein functionality depends, in most cases, on the capability of interacting with a partner and, in turn, on how both molecules can be docked with each other and with the solvent. This docking would not be possible if proteins were rigid and fixed structures. Thus, the understanding of dynamic properties, in terms of both local fluctuations and domain-

domain reorientations, is essential to get insights into protein functionality. On the other hand, protein function and stability depend on the way the protein is folded. This is a consequence, not only of the intra-molecular protein interactions, but mainly, of interactions of the protein with the solvent (water molecules).

### 2.1.1 NMR Versus X-Ray for the Acquisition of Dynamic Information

X-ray diffraction was revealed as the most powerful technique to resolve tridimensional structures of proteins. Nevertheless, there are three drawbacks with this technique. Firstly, the calculated structure belongs to crystallized molecules and not all molecules can be obtained in this form. Secondly, the conformation adopted by the protein under crystallization conditions (usually high salt concentrations) is not necessarily the same as the soluble (typically active) form of the protein. Thirdly, and most importantly with regard to this article, X-ray diffraction does not give information on the dynamics properties of the system.

Although the so-called *temperature* or *B-factor* in a solved crystal structure is indicative of the degree of disorder of the corresponding region, this is not a direct measurement of the mobility itself. In any case, the time scale of the dynamic processes is not extracted from it. X-ray diffraction details very accurately the position of the water molecules in the crystal cell, but, again, offers no information on the time scale of their exchange with the bulk solvent. The knowledge of these data can be relevant in understanding the role of the water molecules in the structure or the function of the molecule.

– Nuclear magnetic resonance (NMR), on the contrary to this, is not only suitable for the determining of the structure of proteins in the solution (ca. 20% of the Protein Data Bank structures have been performed by NMR), but also can proportionate a detailed picture of the mobility of both the backbone and side chain of each individual residue (Peng and Wagner 1994, Dayie et al. 1996, Palmer 2001, Palmer et al. 2001, Bax 2003). NMR can also provide information on the time scale (from pico- to milliseconds) of the observed movements. Location of solvent molecules can also be detected by NMR (Brunner et al. 1993, Otting and Lieppinsh 1995, Bertini et al. 1997, Mesgarzadeh et al. 1998, Wider 1998, Bertini et al. 2000). More importantly, NMR can discriminate water molecules that remain in protein cavities longer than the correlation time of the molecule (probably structural or functional water molecules) from those that exchange fast with the bulk solvent (Dalvit and Hommel 1995, Dalvit 1996). Thus, NMR is a unique technique that permits the complete structural and dynamic characterization of a protein as well as of its hydration properties.

## 2.1.2 Dynamics of Proteins and NMR

### 2.1.2.1 Theoretical Considerations

When a molecule is placed into a magnetic field, the NMR active nuclei orient their magnetic moments and create a net magnetization in the direction of the applied field (by convention,  $z$ -axis), while the net magnetization perpendicular to that magnetic field (plane  $xy$ ) is zero. If we perturb (typically with a pulse) the system, it will tend to restore the equilibrium state via a process termed relaxation. The time that the net magnetization needs to recover the equilibrium will depend on the capability of each individual spin to exchange its excess of energy with the environment. Two relaxation times are currently defined: one related with the time that the magnetic moment takes to reach the equilibrium condition in the  $z$  axis (longitudinal relaxation time,  $T_1$ ); and the other is, related with the time that the magnetization takes to reach the equilibrium condition (net magnetization equal to zero) in the  $xy$  plane (transversal relaxation time,  $T_2$ ).

Relaxation is caused by fluctuation of magnetic dipoles around the concerned nucleus. In the solution, the rate of these fluctuations depends on the overall molecular tumbling and also on the internal motions. Therefore, nuclear relaxation in solution is always intrinsically dependent on the dynamics of the nuclei and, hence, on the mobility of each residue.

Based on sensitivity considerations,  $^1\text{H}$  would be the most appropriate nucleus to be investigated. However, proton relaxation is always the sum of many interactions of comparable intensity and, hence, it is very complex to analyze in terms of internal dynamics. In contrast, the relaxation mechanisms of the  $^{15}\text{N}$  nuclei in a protein uniformly enriched with  $^{15}\text{N}$  are much simpler to predict and to account for. Indeed, the two mechanisms contributing to  $^{15}\text{N}$  relaxation are the chemical shift anisotropy of  $^{15}\text{N}$  nuclei (not discussed here) and the dipole–dipole coupling with its amide proton (Barbato et al. 1992; Peng and Wagner 1994, Tjandra et al. 1996). Among all backbone groups, both effects are essentially constant and only depend on the internal mobility of each individual backbone atom in the molecular frame. This makes  $^{15}\text{N}$  an ideal nucleus to map internal dynamics in proteins.

The study of  $^{13}\text{C}$  in a double ( $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$ ) labeled sample is a sort of intermediate state (Atkinson and Lefèvre 1999, Guenneugues et al. 1999, Walsh et al. 2001). Let us consider the case of a  $^{13}\text{C}$  nucleus. Here, the main source of relaxation is still the dipolar coupling with  $\text{H}\alpha$  protons, but there are important couplings with the attached carbon nuclei ( $\text{C}'$ ,  $\text{C}\beta$ ) that cannot be ignored. The situation is simpler in the case of quaternary carbon atoms, like backbone  $^{13}\text{C}'$  carbonyl carbons. Relaxation is here essentially dominated by the strong  $^1J_{\text{C}'-\text{Ca}}$  coupling and by  $\text{C}'$  chemical shift anisotropy (Engelke and Rüterjans 1997). Therefore, the situation in principle is not different from the  $^{15}\text{N}$  case and makes  $^{13}\text{C}'$  appropriate when studying protein dynamics. How-

ever, the ensemble of theoretical, experimental and economical reasons is such that the analysis of  $^{15}\text{N}$  relaxation is by far the most common tool to address backbone dynamics in proteins.

From the experimental point of view, we need to collect both relaxation times  $T_1$  and  $T_2$  (usually expressed as the reciprocal quantities,  $R_1$  and  $R_2$ , respectively) as well as the direct measurement of cross-relaxation occurring between  $^1\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$  spins. This is also available on an experimental basis by means of the nuclear Overhauser effect (NOE) measurements.

Relaxation  $^{15}\text{N}$  parameters ( $R_1$ ,  $R_2$ , and  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NOE), without any further data analysis, provides direct indications on the relative mobility of each nucleus (Peng and Wagner 1994). For instance,  $R_1$  relaxation rates are shorter (or  $R_2$  longer) than the average value in a protein (and, in general, in macromolecules with molecular weight larger than 3–5 kDa) denotes local mobility in the pico- to nanosecond time scale. Small (or even negative)  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NOE values are also indicative of this kind of dynamics in the studied region. In contrast, transversal relaxation rates,  $R_2$ , significantly larger than the average value indicates mobility in the micro- and millisecond time scale.

If we want to obtain not only qualitative information, we should analyze how backbone dynamics can be quantitatively extracted from  $^{15}\text{N}$  relaxation parameters. A full exposition of the theory is reported elsewhere (Abragam 1961, Kowalewski 1987, Barbato et al. 1992; Mandel et al. 1995; Palmer 2001); here, we will comment on this analysis in a pictorial way. The extent of dipole-dipole  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  relaxation as well as that of the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NOE effect are described by the following equations (Mandel et al. 1995; Palmer 2001):

$$R_1(^{15}\text{N}) = Ar_{\text{HN}}^{-3} f_1(\bar{\omega}_\text{H}, \bar{\omega}_\text{N}) \quad (2.1)$$

$$R_2(^{15}\text{N}) = Br_{\text{HN}}^{-3} f_2(\bar{\omega}_0, \bar{\omega}_\text{H}, \bar{\omega}_\text{N}) + R_{\text{ex}} \quad (2.2)$$

$$\text{NOE}(^1\text{H}-^{15}\text{N}) = 1 + Cr_{\text{HN}}^{-3} f_3(\bar{\omega}_\text{H}, \bar{\omega}_\text{N}) \quad (2.3)$$

where  $A$ ,  $B$ , and  $C$  are known constants,  $r_{\text{HN}}$  is the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  distance (0.91 Å), the term  $R_{\text{ex}}$  [Eq. (2.2)] accounts for chemical exchange processes (i.e. in the nano- and millisecond time scale) and the  $f_i$  functions (with  $i=1, 2, 3$ ) are linear combinations of the so-called spectral density function,  $J(\omega)$ . Therefore, the measurement of these relaxation parameters ( $R_1$ ,  $R_2$ , and  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NOE) can provide a detailed description of the spectral density function for each pair  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ .

The magnetic field observed by a  $^{15}\text{N}$  nucleus fluctuates due to its neighbor  $^1\text{H}$  because of the whole protein tumbling and of the local movements. The spectral density functions describe how fluctuations at different frequencies affect the relaxation of a given nucleus. The contribution that a fluctuating field at frequency  $\bar{\omega}$  provides to the nuclear relaxation also depends on the



global molecular motions from the following equation (Abragam 1961, Kowalewski 1987):

$$J(\bar{\omega}) = \frac{\tau_c}{1 + \bar{\omega}^2 \tau_c^2} \quad (2.4)$$

To factorize out internal motions from global reorientation motions due to molecular tumbling, the spectral density functions can be represented on the basis of the approach developed by Lipari and Szabo (Lipari and Szabo 1982, 1982), in the following form:

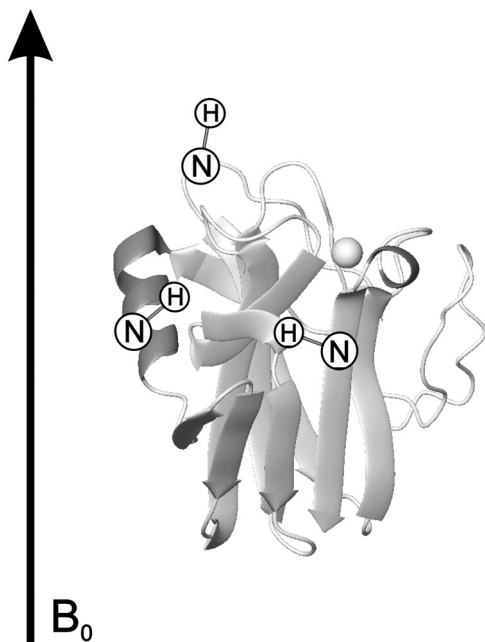
$$J(\bar{\omega}) = \frac{2}{5} \frac{S^2 \tau_r}{1 + (\bar{\omega} \tau_r)^2} + \frac{(1 - S^2) \tau_c}{1 + (\bar{\omega} \tau_c)^2} \quad (2.5)$$

where  $\tau_r$  is the correlation times for the overall tumbling of the molecule and  $\tau_c^{-1} = \tau_r^{-1} + \tau_e^{-1}$ , in which  $\tau_e$  is the correlation time for internal motions. The correlation times account for the time scales in which dynamic processes occur.  $S^2$  is defined as the generalized order parameter. It takes values from 0 to 1. A value of zero for the  $S^2$  parameter indicates a completely free (isotropic) movement of the N-H pair (low degree of order). For an  $S^2$  value of 1, the movement of that pair is completely restricted and anisotropic (maximum order). When an N-H pair rotates with the overall tumbling of the molecule (i.e. if this pair is fixed in the scaffold of the protein, as typically happens to protons present in a  $\beta$ -barrel or in an  $\alpha$ -helix substructure; Fig. 2.1),  $\tau_c = \tau_r$ , and the second term of Eq. (2.5) vanishes. When the residue possesses its own local movements, then  $\tau_c \neq \tau_r$ . In this case, the  $S^2$  provides the quantitative estimate of the degree of local motions while the time scale of this movement ( $\tau_e$ ) can be obtained by these measurements. This is usually the case of loops or less structured regions of proteins (see Fig. 2.1).

### 2.1.2.2 A Quantitative Analysis of the Model-Free Approach

According to the so-called model-free approach, developed by Lipari and Szabo (1982, 1982), fast internal motions can be described by two, model independent, quantities: a generalized order parameter,  $S^2$ , which provides a measure of the amplitude of the motion, and an effective correlation time,  $\tau_e$ . The description of motions slower than the overall molecular tumbling are accounted for with the introduction of the parameter  $R_{ex}$  [Eq. (2.2)].

This three-parameter approach allows the possibility of using several different models to explain the experimental data. Palmer et al. (1991; Mandel et al. 1995; Palmer 2001) have developed a procedure based on the definition of a series of dynamical models and relying on the use of a model selection pro-



**Fig. 2.1.** Ribbon diagram of rusticyanin (1 cur.pdb; Botuyan et al. 1996); the copper ion is displayed as a ball at the top of the molecule. The  $\beta$ -barrel, and the  $\alpha$ -helix are colored in *light* and *dark gray*, respectively. The *arrow* represents the orientation of the magnetic field. Three N-H pairs are specifically plotted: two of them belong to secondary structural elements of the protein (one in the  $\alpha$ -helix, and the other one in the  $\beta$ -barrel), and hence,  $\tau_c$  is equal to  $\tau_r$  for them (see text); the third (at the *top*) is located in a loop. For this last pair,  $\tau_c$  differs from  $\tau_r$ .

tol derived from statistical methods. The steps of this protocol are briefly summarized here:

- *Analysis of the model for whole protein motions:* Local correlation times obtained for each individual N-H pair are statistically fitted versus an input structure of the protein to obtain an initial estimate of the diffusion tensor. Three different models were considered for the diffusion tensor: fully isotropic, axially isotropic or anisotropic movement. The best fit will provide the nature of the overall molecular motion experienced by the investigated system.
- *Analysis of the model for each backbone N-H pair:* Once the diffusion tensor is assumed, relaxation parameters of each N-H pair are individually examined and assigned to one of five different models. In model 1, the internal dynamics experienced by the N-H vector pair can be accounted for by using only a one-parameter fit, which is the generalized order parameter  $S^2$ . In model 2, two parameters are used,  $S^2$  and  $\tau_e$ , thus indicating that a fast correlation time (faster than the overall  $\tau_c$ ) is needed to account for relaxation parameters of individual residues. Models 3 and 4 are equivalent to models 1 and 2, respectively, but also assume the occurrence of chemical exchange rates in the micro- to millisecond time scale, i.e., the  $R_{ex}$  term [Eq. (2.2)] is fitted in both models. Finally, model 5 introduces a second order parameter  $S_f$  and uses an expression for the spectral density function more complex than Eq. (2.5). It accounts for those residues in which the

autocorrelation function cannot be approximated with a single exponential according to the Lipari and Szabo treatment, but it requires at least two exponential functions (Clare et al. 1990).

### 2.1.2.3 Practical Aspects

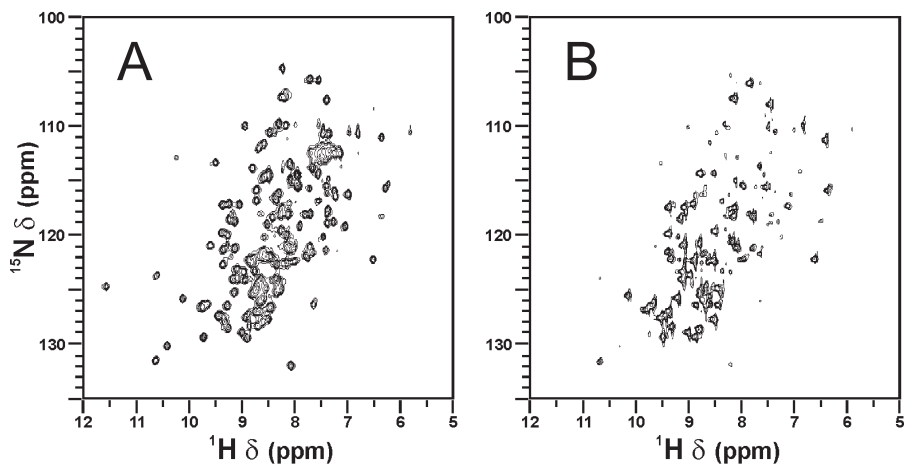
The sensitivity of an NMR experiment as a function of the acquired nuclei is proportional to (Ernst et al. 1987):

$$S/N \propto \gamma_{exc} \gamma_{obs}^{3/2} \left\{ 1 - \exp\left(-t/T_1^{(exc)}\right) \right\} \quad (2.6)$$

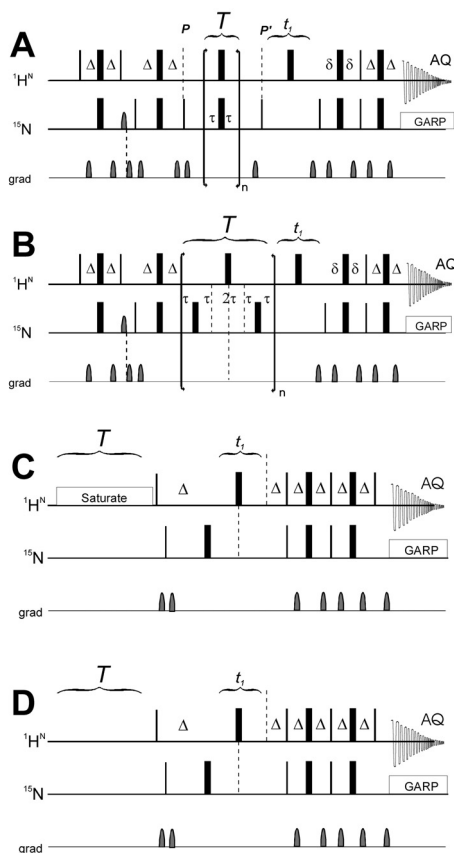
where  $S/N$  is the signal to noise ratio (i.e. the sensitivity of the experiment),  $\gamma_{exc}$  and  $\gamma_{obs}$  are the gyromagnetic ratios of the excited and observed nuclei, respectively, and  $t$  represents the time while the signal is being acquired (the acquisition time). Direct measurements of  $^{15}\text{N}$ -NMR relaxation are performed by exciting and observing  $^{15}\text{N}$  nuclei ( $\gamma_{^{15}\text{N}} = -2.713 \times 10^7 \text{ T}^{-1} \text{ s rad}^{-1}$ ). Inverse experiments are those heteronuclear experiments in which  $^1\text{H}$  nuclei are excited and acquired ( $\gamma_{^1\text{H}} = 2.675 \times 10^8 \text{ T}^{-1} \text{ s rad}^{-1}$ ). In these experiments, the magnetization is transferred from one nucleus to another by heteronuclear polarization transfer mechanisms and the low sensitivity nucleus is always frequency labeled in the indirect dimensions.

Equation (2.6) indicates that a  $^{15}\text{N}$ -NMR experiment performed in the direct mode is ca. 350 times less sensitive than corresponding inverse experiments. The basic inverse experiment is the heteronuclear  $^{15}\text{N}$  single quantum coherence (HSQC) experiment (Bodenhausen and Ruben 1980), a 2D experiment that relates an amide  $^1\text{H}$  with its attached  $^{15}\text{N}$ . For a moderately large protein, this experiment allows the resolution of each individual N-H peak (fingerprint), to provide a very sensitive tool for a quick map of local structural rearrangements. In Fig. 2.2, the HSQC spectrum of rusticyanin is depicted. This protein possesses 155 amino acids, each of them (except the N-terminal and the proline residues) gives rise to a peak in the HSQC. As observed, most of the peaks are very well resolved. In the different experiments to measure the relaxation properties of the  $^{15}\text{N}$  nuclei, a set of these experiments with a varying specific parameter (a delay time) of the corresponding pulse sequence is recorded. The intensity of the observed peak is modulated by this parameter according to the relaxation property of the  $^{15}\text{N}$  nucleus. By fitting the intensity of the observed peak versus the value of that parameter, the relaxation property of the  $^{15}\text{N}$  nucleus can be measured.

The typical experiment to measure  $^{15}\text{N}$   $R_1$  relaxation (Peng and Wagner 1994) is shown in Fig. 2.3A. It is based on a polarization transfer from  $^1\text{H}$  to  $^{15}\text{N}$  magnetization whose frequency is labeled. Then,  $^{15}\text{N}$  magnetization is rotated along the  $z$  axis and, during the period  $T$ , each individual  $^{15}\text{N}$  nucleus is allowed to relax. The intensity of the acquired signal will depend on the  $^{15}\text{N}$   $T_1$ .



**Fig. 2.2.**  $^{15}\text{N}$ -HSQC spectrum of copper(I) rusticyanin performed at 500 MHz (2.0 mM, pH 5.5, acetate buffer 0.1 M, 296 K): A in  $\text{H}_2\text{O}$ ; B 1 week after having dissolved the sample in  $\text{D}_2\text{O}$



**Fig. 2.3.** Pulse sequences used to determine: A  $^{15}\text{N}$  longitudinal relaxation rates,  $R_1$  (Peng and Wagner 1994); B  $^{15}\text{N}$  transversal relaxation rates,  $R_2$  (Kay et al. 1992; Peng and Wagner 1994); C and D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NOE values (Grzesiek and Bax 1993). In sequence A, the  $^{15}\text{N}$  900 pulse P takes  $^{15}\text{N}$  magnetization to the z-axis. Then during the period  $T$  the  $^{15}\text{N}$  nucleus relaxes (according to its  $T_1$ ). The second 900 pulse (pulse P') turns  $^{15}\text{N}$  magnetization towards the  $xy$  plane. The rest of the sequence is a typical HSQC spectrum. In sequence B, the  $^{15}\text{N}$  magnetization is always on the  $xy$  plane. During the period  $T$ ,  $^{15}\text{N}$  nuclei relax according to their  $T_2$  values. For determining both  $T_1$  and  $T_2$  for each  $^{15}\text{N}$  nuclei series of this experiment, varying the delay  $T$  is acquired. Sequences C and D are almost the same: in the first, the amide protons are saturated (real NOE spectrum); while in sequence D, the amide protons are not saturated (NOE reference spectrum).  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NOE values are obtained from the intensity ratio observed in these two experiments (see text)

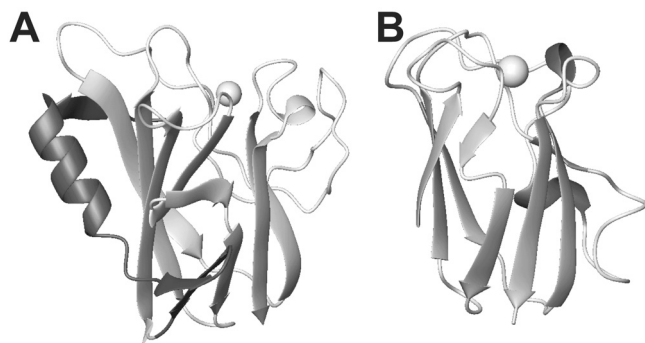
The experiment to measure  $^{15}\text{N}$   $R_2$  relaxation (Kay et al. 1992; Peng and Wagner 1994) is shown in Fig. 2.3B. At variance with the previous one, each  $^{15}\text{N}$  magnetization is not rotated onto the  $z$ -axis, and therefore, each signal is allowed to relax in the  $x,y$  plane during the period  $T$ . Now, the intensity of the acquired signal will vary in accordance with its  $T_2$ . Pulses of  $180^\circ$  applied to both  $^1\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$  during the variable relaxation delay  $T$  are required to prevent the evolution of chemical shifts and cross correlation effects (the latter will not be discussed here), which may affect the analysis of relaxation rates.

Figure 2.3C reports the experiment to collect  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NOE values (Grzesiek and Bax 1993). Basically, amide  $^1\text{H}$  resonances are saturated before transferring the magnetization to the  $^{15}\text{N}$  nucleus. Therefore, the intensity of each peak will depend on the cross relaxation operative between each  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  pair. This intensity is then compared with reference experiment (reported in Fig. 2.3D) in which the  $^1\text{H}$  amide spins are not excited.

### 2.1.3 The System: Rusticyanin

As an example of the information that NMR provides on protein dynamics and hydration, we can give an account here on the study of rusticyanin (Rc hereafter). Rc is the most abundant protein in the Gram negative bacterium *Thiobacillus ferrooxidans* (*Tf*), that lives in very acidic media by oxidizing the FeII ion to FeIII (Ingledeu et al. 1977, Ronk et al. 1991). Thus, this protein is very stable at pH values lower than 2.5 (Cobley and Haddock 1975, Cox and Boxer 1978, Hall et al. 1996). Rc belongs to a class of proteins denominated blue copper proteins (BCPs) (Gray et al. 2000, Randall et al. 2000). The copper ion in these proteins presents a redox potential higher than that of the CuII/CuI pair in aqueous solution. Rc is the BCP with the highest redox potential (680 mV) (Ingledeu and Cocco 1980, Blake and Shute 1987, Shoham 1992, Hall et al. 1999).

As all BCP, Rc topology consists of a  $\beta$ -barrel structure with a copper ion in the so-called “north pole” of the molecule (Fig. 2.4A). These structural elements are, in the case of Rc, supplemented with an extension of 35 amino acids (N-35 extension, hereafter), not present in other BCPs (Djebli et al. 1992; Grossmann et al. 1995; Botuyan et al. 1996, Walter et al. 1996, Grossmann et al. 2002) (see Fig. 2.4A). This extension contains an  $\alpha$ -helix and three  $\beta$ -strands, the first two being anti-parallel. For comparison, the tridimensional structure of plastocyanin from *Synechocystis* sp. PCC6803 (Bertini et al. 2001) is displayed in Fig. 2.4B. We will report here how  $^{15}\text{N}$  relaxation data will account for the specific structural features of rusticyanin and how internal dynamics and protein hydration is important to address structure-function relationships in this protein.



**Fig. 2.4.** Ribbon diagram of A Rc; B Pc (Bertini et al. 2001).  $\beta$ -Barrels are displayed in *light gray*. Rusticyanin N-35 terminal extension is displayed in *dark gray*

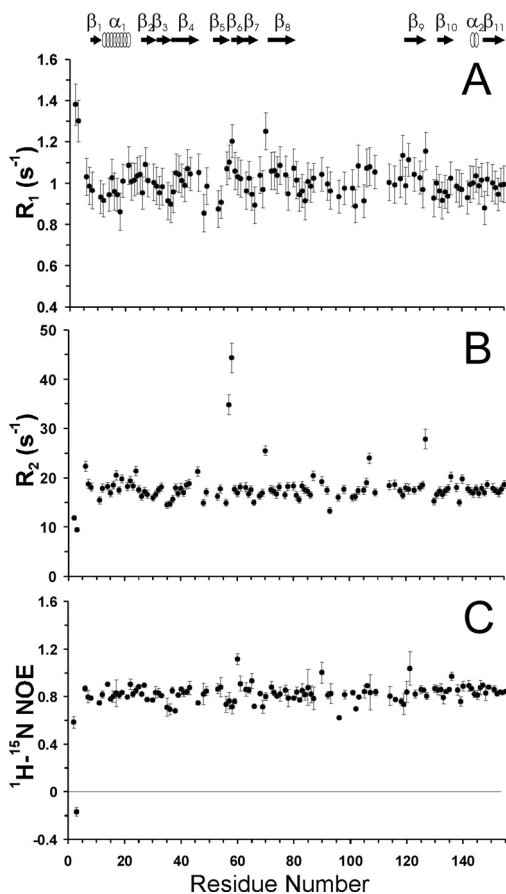
## 2.2 Results and Discussion

### 2.2.1 Relaxation Properties of Rusticyanin

#### 2.2.1.1 Relaxation Data

Figure 2.5A–C displays the relaxation data ( $R_1$ ,  $R_2$ , and  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NOE) per residue for Cu(I)Rc (acetate buffer 50 mM, pH 5.5, 296 K). As outlined above, the direct analysis of relaxation data provides a quantitative indication of the occurrence of regions or domains characterized by peculiar features in terms of internal mobility. Large  $R_1$ , small  $R_2$  and small  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NOE values are indicative of fast internal motions in the pico- or nanosecond time scale. The average value of the longitudinal relaxation rates ( $R_1$ ) of the  $^{15}\text{N}$  backbone nuclei was  $1.00 \pm 0.06 \text{ s}^{-1}$ . Six residues (Thr2, Leu3, Asp58, Ala70, Lys119, Trp127) exhibit  $R_1$  values significantly larger than this average value. The average value of the transversal relaxation rates ( $R_2$ ) was  $17.4 \pm 1.2 \text{ s}^{-1}$ . Five residues (Thr2, Leu3, Gly35, Lys36, and Gly93) have  $R_2$  values smaller than the average. The average NOE value for Rc was  $0.83 \pm 0.04$ . Eleven residues (Thr2, Leu3, Gly35, Lys36, Val38, Val56, Asp58, Ile66, Gly69, Tyr96, Ile102) have NOE values lower than this average NOE (remarkably, Leu3 NOE is negative). All these experimental data indicates that the most flexible region of the molecule is the N-terminal domain (residues Thr2, and Leu3, see Fig. 2.4). The region encompassing amino acids 35–38, 66–70 and 93–96 are the other two loops of the protein with internal motions in the sub-nanosecond time scale.

The occurrence of conformational exchange, i.e., mobility in the micro- or millisecond time scale can be qualitatively detected from Fig. 2.5B. According to Eq. (2.2), chemical exchange ( $R_{ex}$ ) may directly contribute to  $R_2$ . Therefore, residues with  $R_2$  values, clearly above the average, experience an additional contribution to their average values expected in the absence of such motions. This is the case of the region 57–58, which is unambiguously above the general trend of the molecule (Fig. 2.5B). This is indicative of conformational



**Fig. 2.5.** Relaxation data for reduced rusticyanin (3.0 mM, pH 5.5, 296 K): **A** longitudinal relaxation rates,  $R_1$ ; **B** transversal relaxation rates,  $R_2$ ; **aC**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NOE values. The secondary structural elements of Rc are also displayed at the top of figure

exchange phenomena occurring in time scales longer than the nanosecond time. Remarkably, His57 is the residue with the highest  $R_2$  value. Since the pH value of our experiments (5.5) is coincident with the  $\text{pK}_a$  value of the imidazole side chain of a free histidine, it is reasonable to assume that protonation/deprotonation of this histidine produces two different conformations in our molecule. Its physiological relevance (if any) cannot be deduced from the present study.

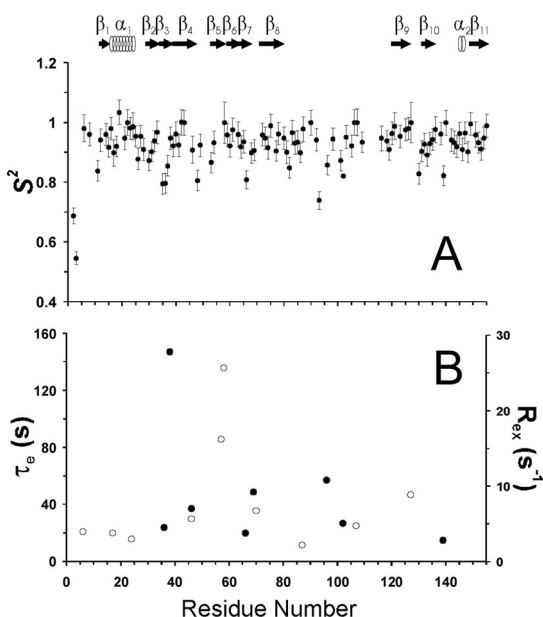
To further understand the nature of the detected motions and for the exact knowledge of their time scales a model-free analysis was performed with the relaxation parameters.

### 2.2.1.2 An Analysis of the Generalized Order Parameter in Rc

Relaxation ( $R_1$ , and  $R_2$ ) data of Rc were analyzed according to the well established procedure of Palmer et al. (Palmer et al. 1991; Mandel et al. 1995) They were satisfactorily fitted by using the isotropic model. The effective correlation time,  $\tau_r$ , for Rc was 13.2 ns. The order parameter,  $S^2$ , was calculated for each residue by applying the model free analysis and according to the four dynamic models mentioned above. Figure 2.6A displays the  $S^2$  values for the 111 residues whose relaxation properties have been determined. The average value is  $0.93 \pm 0.03$ .

The overall trend of the order parameter reflects the secondary structure elements of the protein, with the highest values for the  $\alpha$ -helix (0.93) and the  $\beta$ -strand (0.94) motifs and the largest flexibility in the short loop regions. The low values of residues 2–3 and 35–36 indicate that the mobility of the N-terminus and the 35–37 region is higher than that of the rest of the molecule. Other residues with low  $S^2$  values are all located in loop regions of the protein (such as Gly48, Ile66, Gly93, Ile102, Thr130, Gln139).

Ninety-four out of 111 analyzed amino acids (84.7%) fit within model 1 of the model-free analysis. Seven residues (Lys36, Val38, Ile66, Gly69, Tyr96, Ile102, Gln139) were fitted by taking into account fast internal motions in the sub-nanosecond time scale (model 2). Two of them, Lys36 and Val38, are located in a region that has on average a mobility higher than the rest of the protein. The same consideration also holds for Tyr96. Tyr96 is located in a



**Fig. 2.6.** A Generalized order parameter,  $S^2$ , versus the residue number for the reduced Rc (3.0 mM); B, correlation times,  $\tau_e$ , for residues with fast internal motions (these residues have been fitted according to models 2 or 4, filled dots); exchange rates,  $R_{ex}$ , for residues implicated in dynamics in the micro- or millisecond time scale (models 3 or 4, open dots). The secondary structural elements of Rc are also displayed at the top of the figure



Gly-Pro-Pro-Tyr stretch. The correlation times ( $\tau_e$ ) observed for these residues, shown in Fig. 2.6B, vary between 15 and 147 ps.

Nine residues (Fig. 2.6B) are only fitted when an exchange time constant in the millisecond time scale is introduced (model 3). The model-free analysis also reveals the existence of conformational exchange phenomena ( $R_{ex}$ ) for these residues in time scales longer than the overall molecular tumbling. These exchange rates are in the 2.2–25.7 Hz range. While most of them are lower than 5 Hz, which is considered a threshold for the detectability of conformational exchange effects (Zinn-Justin et al. 1997), the region His57-Asp58 is unambiguously above that limit. Finally, Leu46 is the only residue which fits according to model 4, with  $\tau_e$  and  $K_{ex}$  values of 37 ps, and 5.7 Hz, respectively.

### 2.2.2 $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ Exchange Experiments

In order to determine the degree of solvent accessibility,  $^{15}\text{N}$  HSQC experiments performed with a fresh sample prepared in  $\text{D}_2\text{O}$  and were collected from between 3 h to 2 weeks after the  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  exchange. In Fig. 2.2B, one of these HSQC spectra is displayed. The 34.6 % of the assigned N-H groups does not appear in the experiment collected 3 hours after the  $\text{D}_2\text{O}$  exchange. Fifty residues (36.7 %) retain more than 50 % of their initial intensity after 2 weeks. The remaining amino acids have an intermediate behavior. These results are schematically shown in Fig. 2.7. The 47 rapid exchanging residues (in white in Fig. 2.7) are located either at the beginning of the sequence, in the first  $\beta$ -strand, in the 26–37 region, or distributed over the loops connecting the strands of the  $\beta$ -barrel. The longest hydrophilic region corresponds to residues encompassing amino acids 93–130. Forty out of the fifty slow exchanging residues (dark gray in Fig. 2.7) are mainly located in secondary structure elements characteristic of the classical BCP topology: 29 belong to the  $\beta$ -barrel structure; 3 are located in the small  $\alpha$ -helix region in the northern part of the molecule close to the copper site; and 8 are located in loops.

### 2.2.3 Dynamics, Hydration, and Rusticyanin Stability

Mobility studies have been performed in three other BCPs: azurin (Az) from *Pseudomonas aeruginosa* (Kalverda et al. 1999), pseudoazurin (PsAz) from *Paracoccus pantotrophus* (Thompson et al. 2000), and plastocyanin (Pc) from *Synechocystis* sp. PCC6803 (Bertini et al. 2001). For all investigated cases, the average  $S^2$  order parameters have relatively high values (0.87 in Pc, 0.86 in Az, 0.83 in PsAz). Thus, all BCPs have a rigid structure. This is due to the protein scaffold imposed by the Greek key topology of the  $\beta$ -barrel and of the high content in hydrogen-bonds (Gray et al. 2000). This feature allows electron transfer with a low re-organization energy (Gray et al. 2000, Randall et



**Fig. 2.7.** Schematic view of Rc backbone displaying the amide protons with fast (*white*), medium (*light gray*), and slow (*dark gray*)  $D_2O/H_2O$  exchange pattern

al. 2000). In the case of Rc, the average  $S^2$  ( $0.93 \pm 0.03$ ) as well as the average NOE value (0.83 very close to the theoretical maximum, 0.835) indicate an unusually small degree of internal motions, even in comparison with other BCPs.

To get some insights into the specific features of Rc, we focused on those protein regions that are structurally different from other BCPs and those regions that have peculiar dynamic properties. The Rc elements characterized by some degree of internal motions are, in summary, regions 1–5, 35–38, 57–58, 66–70, 93–96 (see Figs. 2.5 and 2.6). Remarkably, residues 1–5 and 33–38 are the most mobile regions. By contrast,  $S^2$  values indicate that the region 5–33 has a very restricted mobility. The long amphipatic helix (see Fig. 2.5A) seems to be (together with the C-terminal side, see below) the most rigid part of the molecule. Rusticyanin has 35 additional amino acids that extend the N-terminus, not present in the rest of BCPs (Grossmann et al. 2002; Fig. 2.4A) Thus, the mobile region (amino acids 33–38) connecting the classic  $\beta$ -barrel (the typical BCP topology) to such N-35 extension acts as a linker between two distinct domains. Crystallographic studies reveal that this extension acts as a belt with respect to the typical  $\beta$ -barrel fold (Walter et al. 1996, Hough et al. 2001, Kanbi et al. 2002). Given the peculiar features of Rc, this extension has been postulated to be the driving factor towards the increased acid stability of this protein. Hasnain and coworkers have recently shown that an N-35 depleted mutant is still soluble in an acidic environment (Grossmann et al. 2002). They also demonstrated that the N-terminal extension is responsible for the shielding of the hydrophobic core. The detailed analysis of hydration properties, that can be performed only by NMR, shows that the 36.7% of Rc amide protons are hidden to the solvent.

Analogous studies performed on Pc (Fig. 2.4B) showed that the non-exchangeable amide protons are only the 17.2% of the residues (Bertini et al. 2001). This is a substantial difference that indicates how the N-terminus extension affects hydration properties of Rc.

Another region characterized by fast internal motions is the turn including amino acids 93–97 (Gly-Pro-Pro-Tyr-Ala). Of course the occurrence of two consecutive proline residues might be responsible for the high mobility. The equivalent residues in other BCPs (residues 46–49 in Pc (Bertini et al. 2001), 74–76 in Az (Kalverda et al. 1999), and 52–56 in PsAz (Thompson et al. 2000)), in which no prolines are present, also show a high degree of mobility in the same time scale. Indeed, this is the most mobile region for all these proteins (with the exception of the N-terminal residues). This turn is a part of a long loop connecting two strands in BCP. The first domain, encompassing residues 83–92, has essentially order parameter values (average  $S^2$  in the region is 0.93) similar to those of the  $\beta$ -barrel regions even in the absence of defined secondary structure elements. Azurin, which has an  $\alpha$ -helix in this region shows high  $S^2$  values (Kalverda et al. 1999), although not as high as in Rc. In contrast, the degree of order in PsAz, with no defined secondary structure in this region, is lower than in Az and in Rc. Therefore, the high rigidity of Rc does not arise from a large content in secondary structure, but has to arise from tertiary interactions.

#### 2.2.4 Mobility, Hydrophobicity, and High Redox Potential

Copper in Rc is bound to the side chain of four amino acids (Walter et al. 1996). Three of these copper ligands (Cys138, His143, and Met148) belongs to the two  $\beta$ -strands at the C-terminal end of Rc or to the loop interconnecting them. Our data shows that these two  $\beta$ -strands form one of the most rigid and highly shielded from solvent interaction regions of Rc. This could have two implications: (1) the larger protection of the backbone would provide an additional stabilizing effect, thus protecting against protein denaturation. (2) the dynamic, and thus, the structural properties of the copper ligands Cys138 and Met148 are driven by the interactions of these two  $\beta$ -strands, as we have already proposed (Donaire et al. 2002). Therefore, the high rigidity and hydrophobicity of these two antiparallel  $\beta$ -strands provides the metal center with its unique features. Indeed, a highly hydrophobic environment of the copper ion would increase the redox potential of the protein, as previously appointed (Walter et al. 1996, Donaire et al. 2001). This would be in agreement with the entatic or rack state mechanism for the copper ion (Malmström 1994, Gray et al. 2000). It would also explain the facility of the interconversion copperI/copperII. The other two ligands, histidines 85 and 143, also have a very high  $S^2$  value, indicating the high rigidity of the active center.

## 2.3 Conclusions

Our present study reveals that Rc is very rigid and highly hydrophobic. Not only secondary structural elements, but also tertiary interactions must be relevant in keeping the rigidity of Rc. The first N-35 domain, unique of this BCP, acts as an independent module of the whole protein and is partially responsible for the high degree of hydrophobicity of this protein. The hydrophobic environment is also present in copper ion surroundings. All these features are related (and, probably, are the crucial factors) in providing Rc its atypical thermodynamic properties (high stability at low pH values, and high redox potential).

This is another more example of how NMR can correlate structural-function relationships of a protein, via, in this case, its dynamic characterization.

*Acknowledgements.* Drs. S. Samar Hasnain (CCLRC Daresbury Laboratory) and John F. Hall (De Monfort University) are acknowledged for providing us with *E. coli* with the Rc plasmid. B.J. and M.P. would like to thank the Conselleria de Educación y Ciencia (Generalitat Valenciana) for a grant. This work was supported with financial aid from the DGICYT-Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain (BQU2002-02236). The support from the European Large Scale Facility PARABIO at the University of Florence, Italy (contract no. HPRI-CT-1999-00009) is acknowledged.

## References

- Abraham A (1961) *The Principles of Nuclear Magnetism*. Oxford University Press, Oxford
- Atkinson RA, Lefèvre J-F (1999) Reduced spectral density mapping for proteins: validity for studies of  $^{13}\text{C}$  relaxation. *J. Biomol. NMR* 13:83–88
- Barbato G, Ikura M, Kay LE, Pastor RW, Bax A (1992) Backbone dynamics of calmodulin studied by  $^{15}\text{N}$  relaxation using inverse detected two-dimensional NMR spectroscopy; the central helix is flexible. *Biochemistry* 31:5269–5278
- Bax A (2003) Weak alignment offers new NMR opportunities to study protein structure and dynamics. *Protein. Sci.* 12:1–16
- Bertini I, Bryant DA, Ciurli S, Dikiy A, Fernandez CO, Luchinat C, Safarov N, Vila AJ, Zhao J (2001) Backbone dynamics of plastocyanin in both oxidation states. Solution structure of the reduced form and comparison with the oxidized state. *J. Biol. Chem.* 276:47217–47226
- Bertini I, Dalvit C, Luchinat C, Huber JG, Piccioli M (1997) e-PHOGSY Experiments on a paramagnetic protein: location of the catalytic water molecule in the heme crevice of the oxidized form of Horse Heart Cytochrome c. *FEBS Lett.* 415:45–48
- Bertini I, Huber JG, Luchinat C, Piccioli M (2000) Protein hydration and location of water molecules in oxidized horse heart cytochrome c by  $(^1\text{H})\text{NMR}$ . *J. Magn. Reson.* 147:1–8
- Blake RC 2nd, Shute EA (1987) *Respiratory enzymes of Thiobacillus ferrooxidans*. A kinetic study of electron transfer between iron and rusticyanin in sulfate media. *J. Biol. Chem.* 262:14983–14983
- Bodenhausen G, Ruben DJ (1980) Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* 69:185–189

- Botuyan MA, Toy-Palmer A, Chung J, Blake RC 2nd, Beroza P, Case DA, Dyson HJ (1996) NMR Solution Structure of Cu(I) Rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans*: Structural Basis for the Extreme Acid Stability and Redox Potential. *J.Mol.Biol.* 263: 752–767
- Brunne RM, Lieppinsh E, Otting F, Wüthrich K, van Gunsteren WF (1993) Hydration of Proteins. A Comparison of Experimental residence times of Water Molecules Solvating the Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor with Theoretical Model Calculation. *J.Mol.Biol.* 231:1040–1048
- Clare GM, Driscoll PC, Wingfield PT, Gronenborn AM (1990) Analysis of the backbone dynamics of interleukin-1 beta using two-dimensional inverse detected heteronuclear  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. *Biochemistry* 29:7387–7401
- Cobley JG, Haddock BA (1975) The respiratory chain of *Thiobacillus ferrooxidans*: the reduction of cytochromes by  $\text{Fe}^{2+}$  and the preliminary characterization of rusticyanin a novel “blue” copper protein. *FEBS Lett.* 60:29–33
- Cox JC, Boxer DH (1978) The purification and some properties of rusticyanin, a blue copper protein involved in iron(II) oxidation from *Thiobacillus ferro-oxidans*. *Biochem.J.* 174:497–502
- Dalvit C (1996) Homonuclear 1D and 2D NMR experiments for the observation of solvent-solute interactions. *J. Magn. Reson. Ser. B* 112:282–288
- Dalvit C, Hommel U (1995) Sensitivity-improved detection of protein hydration and its extension to the assignment of fast-exchanging resonances. *J.Magn.Reson.Ser.B* 109: 334–338
- Dayie KT, Wagner G, Lefevre JF (1996) Theory and practice of nuclear spin relaxation in proteins. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 47:243–282
- Djebli A, Proctor P, Blake RC 2nd, Shoham M (1992) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans*. *J.Mol.Biol* 227:581–582
- Donaire A, Jiménez B, Fernández CO, Pierattelli R, Niizeki T, Moratal JM, Hall JF, Kohzuma T, Hasnain SS, Vila AJ (2002) Metal-Ligand Interplay in Blue Copper Proteins Studied by  $^1\text{H}$  NMR Spectroscopy: Cu(II)–Pseudoazurin and Cu(II)–Rusticyanin. *J. Am.Chem. Soc.* 124:13698–13708
- Donaire A, Jiménez B, Moratal JM, Hall JF, Hasnain SS (2001) Electronic Characterization of the Oxidized State of the Blue Copper Protein Rusticyanin by  $^1\text{H}$  NMR: is the axial Methionine the Dominant Influence for the High Redox Potential. *Biochemistry* 40:837–846
- Engelke J, Rüterjans H (1997) Backbone dynamics of proteins derived from carbonyl carbon relaxation times at 500, 600 and 800 MHz: Application to ribonuclease T1. *J. Biomol. NMR* 9:63–78
- Ernst RR, Bodenhausen G, Wokaun A (1987) Principles of Nuclear Magnetic Resonance in one and two dimensions. Oxford University Press, London
- Gray HB, Malmström BG, Williams RJP (2000) Copper coordination in blue proteins. *JBIC* 5:551–559
- Grossmann JG, Hall JF, Kanbi LD, Hasnain SS (2002) The N-terminal extension of rusticyanin is not responsible for its acid stability. *Biochemistry* 41:3613–3619
- Grossmann JG, Ingledew WJ, Harvey I, Strange RW, Hasnain SS (1995) X-ray absorption studies and homology modeling define the structural features that specify the nature of the copper site in rusticyanin. *Biochemistry* 34:8406–8414
- Grzesiek S, Bax A (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115:12593–12594
- Guenneugues M, Gilquin B, Wolff N, Menez A, Zinn-Justin S (1999) Internal motion time scales of a small, highly stable and disulfide-rich protein: a  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR and molecular dynamics study. *J. Biomol NMR* 14:47–66

- Hall JF, Hasnain SS, Ingledew WJ (1996) The structural gene for rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans*: cloning and sequencing of the rusticyanin gene. FEMS Microbiol.Lett. 137:85–89
- Hall JF, Kanbi LD, Strange RW, Hasnain SS (1999) Role of the axial ligand in type 1 Cu centers studied by point mutations of Met148 in rusticyanin. Biochemistry 38:12675–12680
- Hough MA, Hall JF, Kanbi LD, Hasnain SS (2001) Structure of the M148Q mutant of rusticyanin at 1.5 Å: a model for the copper site of stellacyanin. Acta Cryst. D 57:355–360
- Ingledew WJ, Cocco D (1980) Biochim.Biophys.Acta 590:141–158
- Ingledew WJ, Cox JC, Halling PJ (1977) FEMS Microbiol. Lett. 2:193–197
- Kalverda AP, Ubbink M, Gilardi G, Wijmenga SS, Crawford A, Jeuken LJ, Canters GW (1999) Backbone dynamics of azurin in solution: slow conformational change associated with deprotonation of histidine 35. Biochemistry 38:12690–12697
- Kanbi LD, Antonyuk S, Hough MA, Hall JF, Dodd FE, Hasnain SS (2002) Crystal Structures of the Met148Leu and Ser86Asp Mutants of Rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans*: Insights into the Structural Relationship with the Cupredoxins and the Multi Copper Proteins. J. Mol. Biol. 320:263–275
- Kay LE, Nicholson LK, Delaglio F, Bax A, Torchia DA (1992) Pulse sequences for removal of the effects of cross correlation between dipolar and chemical-shift anisotropyrelaxation mechanisms on the measurement of heteronuclear T1 and T2 values in proteins. J. Magn. Reson. 97:359–375
- Kowalewski J (1987) Nuclear Spin Relaxation in Diamagnetic Fluids Part 2: Organic Systems and Solutions of Macromolecules and aggregates. Annu. Rep. NMR Spectrosc. 23:
- Lipari G, Szabo A (1982) Model-Free Approach to the interpretation of Nuclear Magnetic Resonance Relaxation in Macromolecules. 1. Analysis of Experimental Results. J. Am. Chem. Soc. 104:4559–4570
- Lipari G, Szabo A (1982) Model-Free Approach to the interpretation of Nuclear Magnetic Resonance Relaxation in Macromolecules. 1. Theory and Range of Validity. J. Am. Chem. Soc. 104:4546–4559
- Malmström BG (1994) Rack-induced bonding in blue-copper proteins. Eur. J. Biochem. 233:711–718
- Mandel AM, Akke M, Palmer AG 3rd (1995) J.Mol.Biol. 246:144–163
- Mesgarzadeh A, Pfeiffer S, Engelke J, Lassen D, Ruterjans H (1998) Bound water in apo and holo bovine heart fatty-acid-binding protein determined by heteronuclear NMR spectroscopy. Eur. J. Biochem. 251:781–786
- Otting G, Lieppinsh E (1995) Protein Hydration viewed by high-resolution NMR Spectroscopy: implications for Magnetic Resonance Image Contrast. Acc. Chem. Res. 28:171–177
- Palmer AG 3rd, Rance M, Wright JG (1991) J.Am.Chem.Soc. 113:4371–4380
- Palmer AG 3rd (2001) NMR probes of molecular dynamics: overview and comparison with other techniques. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 30:129–155
- Palmer AG 3rd, Kroenke CD, Loria JP (2001) Nuclear magnetic resonance methods for quantifying microsecond-to-millisecond motions in biological macromolecules. Methods Enzymol. 339:204–238
- Peng JW, Wagner G (1994) Investigation of protein motions via relaxation measurements. Methods Enzymol. 239:563–596
- Randall DW, Gamelin DR, LaCroix LB, Solomon EI (2000) Electronic Structure contributions to electron transfer in blue Cu and CuA. JBIC 5:16–19
- Ronk M, Shively JE, Shute EA, Blake RC 2nd (1991) Amino acid sequence of the blue copper protein rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans*. Biochemistry 30:9435–9442

- Shoham M (1992) Rusticyanin: Extremes in acid stability and redox potential explained by the crystal structure. *J. Mol. Biol.* 227:581–582
- Thompson GS, Leung YC, Ferguson SJ, Radford SE, Redfield C (2000) The structure and dynamics in solution of Cu(I) pseudoazurin from *Paracoccus pantotrophus*. *Protein Sci.* 9:846–858
- Tjandra N, Szabo A, Bax A (1996) Protein Backbone Dynamics and  $^{15}\text{N}$  Chemical Shift Anisotropy from Quantitative Measurement of Relaxation Interference Effects. *J. Am. Chem. Soc.* 118:6986–6991
- Walsh ST, Lee AL, DeGrado WF, Wand AJ (2001) Dynamics of a de novo designed three-helix bundle protein studied by  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ , and  $^2\text{H}$  NMR relaxation methods. *Biochemistry* 40:9560–9569
- Walter RL, Ealick SE, Friedman AM, Blake RC 2nd, Proctor P, Shoham M (1996) Multiple wavelength anomalous diffraction (MAD) crystal structure of rusticyanin: a highly oxidizing cupredoxin with extreme acid stability. *J. Mol. Biol.* 263:730–751
- Wider G (1998) Technical aspects of NMR spectroscopy with biological macromolecules and studies of hydration in solution. *Prog. NMR Spectrosc.* 32:193–275
- Zinn-Justin S, Berthault P, Guenneugues M, Desvaux H (1997) Off-resonance RF fields in heteronuclear NMR. Application to the study of slow motions. *J. Biomol. NMR* 10:363–372

