

## Historias de la RMN

Jorge Santoro

### 20. Estructura tridimensional de proteínas

Uno de los mayores logros de la espectroscopía de RMN lo constituye su capacidad de asignar prácticamente por completo los espectros de proteínas y de calcular su estructura tridimensional. El desarrollo de la metodología necesaria fue llevado a cabo por Kurt Wüthrich y su grupo, por lo que este artículo se va a centrar, tras una breve introducción del tipo de estudios previos, en los distintos avances de su grupo que condujeron a esta conquista.

En 1957 Martin Saunders, Arnold Wishnia y John Kirkwood publicaron el primer espectro de RMN de una proteína (1), el de la ribonucleasa A disuelta en D<sub>2</sub>O obtenido a 40 MHz. Casi inmediatamente Oleg Jardetzky, basándose en los desplazamientos químicos de los aminoácidos, hizo una interpretación completa del contenido de los cuatro picos extremadamente anchos que se observaban en el espectro (2). A pesar de este "éxito", la falta de resolución de señales individuales impedía los estudios de proteínas por RMN. Afortunadamente a medida que se mejoraron las características de los espectrómetros y se incrementó su campo magnético se encontraron señales que aparecían resueltas fuera de estas amplias bandas espectrales.

Los artículos de Arthur Kowalsky (3) y de Morton Mandel (4) llamaron la atención sobre las resonancias de los aminoácidos aromáticos que aparecían en un extremo del espectro, separadas de las envolventes del resto de señales y resueltas. De particular interés era el caso de la histidina, un aminoácido que en muchos casos forma parte del centro activo de enzimas, puesto que es el único aminoácido que puede actuar como ácido o como base en el intervalo de pH fisiológico. Además, la señal del protón HD2 aparecía separada del resto de los protones aromáticos. El tipo de investigación que permitía este hecho se ilustra bien con su aplicación al estudio de la ribonucleasa A. A partir de la determinación de los pK<sub>a</sub> de las histidinas, determinados mediante el registro de espectros a distintos valores del pH, y utilizando tanto la estructura tridimensional de rayos X como la modificación química de algunos residuos, fue posible asignar las señales de las cuatro histidinas (5-7). Posteriormente se realizarían estudios similares con otras proteínas, que se verían facilitados por el incremento en el campo magnético de los espectrómetros. Estos estudios, al igual que los de proteínas paramagnéticas que comentaremos a continuación, se basaban en la estructura tridimensional de la proteína obtenida por rayos X, en observaciones relacionadas con sus propiedades funcionales o en modificaciones químicas.

Arthur Kowalsky, además de la resolución de las señales de los residuos aromáticos, descubrió dos resonancias anchas a un campo anormalmente alto (muy apantalladas) en los espectros del citocromo c y de la mioglobina, atribuyéndolas a cadenas laterales sometidas a los efectos de la corriente del anillo de la porfirina (3). Posteriormente amplió el estudio del citocromo c (8) e informó de la primera observación de resonancias desplazadas por efectos paramagnéticos, resonancias que aparecían muy fuera del rango normal de desplazamientos químicos y que desaparecían en los espectros de la forma diamagnética de la proteína. Uno de los investigadores que aprovechó este hecho para obtener información sobre la estructura molecular de hemoproteínas fue Kurt Wüthrich, un quimicofísico suizo. Wüthrich tomó contacto con el tema durante su estancia postdoctoral en el

grupo de Robert Shulman en los laboratorios Bell, en Murray Hill, Estados Unidos. Tras su vuelta a Suiza publicaría un amplio compendio de sus contribuciones en el tema (9), compendio que presentó para conseguir la habilitación en la Escuela Politécnica Federal de Zúrich (ETH).

Una vez instalado en el ETH, Wüthrich complementó el estudio de proteínas paramagnéticas con el de oligopéptidos (10), lo que poco a poco le llevó a centrar su trabajo en las proteínas diamagnéticas. Para no competir con los grupos líderes del tema decidió descartar las proteínas habituales en esos estudios: ribonucleasa, lisozima y nucleasa estafilocócica. Seleccionó el BPTI (*Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor*), una proteína de tan solo 58 residuos, tremendamente estable gracias a sus tres enlaces disulfuro y cuya estructura tridimensional había sido determinada mediante difracción de rayos X. El primer éxito llegó con el descubrimiento del volteo de los residuos aromáticos (11). Gerhard Wagner, durante su tesis doctoral, estaba estudiando los residuos aromáticos del BPTI, que aparecían relativamente bien resueltos puesto que trabajaba con un espectrómetro de 360 MHz. Mediante experimentos de doble resonancia había conseguido asignar las señales de las cuatro tirosinas, que presentaban un patrón AA'BB'. En vista de que el entorno de las tirosinas, situadas en el interior de la proteína, era asimétrico, esperaba que los desplazamientos químicos de los dos protones en orto fueran distintos y lo mismo ocurriera para los dos protones en meta, es decir un sistema ABCD. La equivalencia observada era compatible con una situación en la que el anillo aromático experimentara saltos de 180° alrededor del enlace C<sub>β</sub>-C<sub>γ</sub> a velocidad rápida en la escala de RMN. La confirmación de la existencia de este movimiento de los residuos aromáticos, que no se había detectado mediante rayos X, la obtuvo registrando espectros a varias temperaturas. A 4 °C el espectro de las fenilalaninas mostraba cinco señales resueltas de intensidad un protón. A medida que se aumentaba la temperatura dos de ellas primero desaparecían y luego reaparecían como una única señal al valor medio del desplazamiento químico. Esto demostraba sin lugar a duda la existencia de un equilibrio químico entre dos estados.

El siguiente avance, más trascendental, tardaría tres años. En los estudios de proteínas paramagnéticas Regula Keller y Kurt Wüthrich habían usado con éxito el efecto NOE para asignar las resonancias de los hemos en citocromos (12). Con objeto de superar los inconvenientes de inespecificidad de los NOEs estacionarios en el caso de macromoléculas, Sydney Gordon (13) y Gerhard Wagner (14) habían puesto a punto métodos de medida del NOE transitorio. Con este bagaje Wagner y Wüthrich encargaron en 1978 a Andreas Dubs, cuya tesis de licenciatura codirigían, la medida de los NOEs de los protones amida del BPTI. Cuando se usaban tiempos cortos de crecimiento del NOE, generalmente había una resonancia H<sub>α</sub> que mostraba un efecto mucho mayor que el resto de resonancias. Una inspección de un modelo tridimensional del BPTI les hizo ver que en las láminas β la distancia H<sub>α</sub>(i-1)-H<sub>N</sub>(i) era mucho más corta que el resto de distancia al protón amídico. A partir de este hecho diseñaron un método de asignación secuencial. El NOE relacionaba H<sub>N</sub>(i) con H<sub>α</sub>(i-1). Un experimento de desacoplamiento homonuclear permitía relacionar H<sub>α</sub>(i-1) con H<sub>N</sub>(i-1). Utilizando alternativamente ambos experimentos consiguieron asignar 24 residuos del BPTI (15). La asignación secuencial partía de la asignación conocida de la tirosina-21 y hacía uso de las distancias derivadas de la estructura tridimensional determinada por rayos X, especialmente para alinear las dos hebras de la lámina β del BPTI.

La llegada de la espectroscopía bidimensional facilitó la aplicación de la estrategia de asignación: los experimentos monodimensionales de NOE truncado se sustituyeron por el experimento NOESY y los de desacoplamiento homonuclear por el experimento COSY. Utilizando

éstos y trabajando ya con un espectrómetro de 500 MHz, Wagner consiguió la asignación prácticamente total del espectro de protón del BPTI (16). El experimento COSY, además, le había permitido determinar el tipo de aminoácido de cada sistema de espín ( $H_N$ ,  $H_\alpha$ ,  $H_\beta$ ,...), por lo que podía asignar un conjunto de sistemas de espín sucesivos a residuos concretos de la proteína sin necesidad de recurrir a la estructura tridimensional determinada por rayos X, tal como había empleado en su trabajo anterior.

En el mismo número del *Journal of Molecular Biology* de 1982 aparecían tres artículos más del grupo de Wüthrich, de los que conviene resaltar dos. En uno de ellos (17) se presentaban los resultados que había obtenido Martin Billeter de un análisis exhaustivo de las distancias entre protones en proteínas de estructura tridimensional conocida. La conclusión principal era que las distancias  $H_\alpha$ - $H_N$ ,  $H_N$ - $H_N$  y  $H_\beta$ - $H_N$  cortas, y por lo tanto los correspondientes NOEs intensos, tenían una altísima probabilidad de corresponder a residuos consecutivos. Esta constatación facilitaba enormemente la asignación secuencial, puesto que podía basarse en tres efectos NOE. En el otro artículo (18) Wüthrich proponía un esquema para la determinación de la estructura tridimensional de proteínas a partir de datos de RMN. El método propuesto era consecuencia del éxito obtenido previamente en la determinación de la estructura de segmentos cortos de las cadenas polipeptídicas del glucagón unido a lípidos (19) y de la melitina (20). Establecida la asignación secuencial haciendo uso del espectro COSY y de los NOEs  $H_\alpha$ - $H_N$ ,  $H_N$ - $H_N$  y  $H_\beta$ - $H_N$  intensos, el conjunto total de NOEs podía usarse para definir la estructura tridimensional. Para ello proponía utilizar el método de "geometría de distancias", que a partir de las distancias entre una serie de puntos geométricos permite calcular sus coordenadas. El método había sido adaptado por Werner Braun (19) para su uso a partir de los datos NOE complementados con las distancias de enlace y distancias geminales derivadas de la geometría estándar de los aminoácidos.

En los tres años siguientes el método prácticamente no tuvo aplicación en el cálculo de estructuras tridimensionales. La principal dificultad era computacional, puesto que la matriz de distancias y la matriz métrica derivada de ella eran enormes, así como los tiempos de computación requeridos. El programa de ordenador de Braun no podía tratar más de unos 150 átomos. A pesar de esta limitación Braun había conseguido una determinación casi completa de la estructura 3D del glucagón (21). Puesto que no se observaban NOEs entre residuos separados en más de cuatro posiciones en la secuencia, realizó cálculos para cuatro segmentos del péptido (5-15, 10-20, 17-27 y 19-29). La estructura final la obtenía fusionando la de los cuatro segmentos.

Timothy Havel consiguió, mediante diversas mejoras en el método de cálculo, desarrollar un programa de ordenador, DISGEO, capaz de calcular mediante el método de geometría de distancias las coordenadas cartesianas para proteínas de hasta unos 100 aminoácidos (22). Con esta herramienta resultaba posible aplicar el método a casos más complejos que los ilustrados previamente con polipéptidos. Como prueba de concepto Havel y Wüthrich efectuaron cálculos para el BPTI usando datos simulados (23). La mejor descripción de su trabajo es la que figura en el resumen de la publicación: *Ten sets of geometric constraints which simulate the results available from n.m.r. experiments of varying precision and completeness were extracted from the crystal structure of the basic pancreatic trypsin inhibitor, and conformers consistent with these constraints were computed. Comparison of these computed structures with each other and with the original crystal structure shows that it is possible to determine the global conformation of a polypeptide chain from the distance constraints which are available from n.m.r. experiments.*

En el siguiente artículo de la revista (24) aparecía el cálculo de la estructura tridimensional del inhibidor de proteinasa IIA del plasma seminal de toro, BUSI IIA, una proteína de 57 residuos cuya estructura tridimensional era desconocida. Michael Williamson había registrado espectros NOESY del BUSI IIA a varios tiempos de mezcla, tanto en H<sub>2</sub>O como en D<sub>2</sub>O. Ayudándose de los desplazamientos químicos determinados previamente (25) consiguió asignar 556 señales NOE. De ellas solo 202 resultaban útiles para el cálculo de la estructura tridimensional, puesto que o bien correspondían a distancias fijas en la estructura covalente o bien no eran informativas dada la conversión de intensidad NOE en distancia interatómica. Además de las intensidades de los NOEs disponía de otras restricciones geométricas. Había conseguido identificar los tres enlaces disulfuro de la proteína, lo que le permitía restringir las correspondientes distancias  $S(i)-S(j)$ ,  $S(i)-C_{\beta}(j)$  y  $S(j)-C_{\beta}(i)$ . Combinando la información de los NOEs con la de velocidades lentas de intercambio H/D en los NH había inferido la posición de varios enlaces de hidrógeno  $NH\cdots O=C$ . Esto permitía especificar restricciones de distancias que obligaran a la formación de enlaces de hidrógeno en las estructuras calculadas. También había medido las constantes de acoplamiento  $H_{\alpha}-H_N$  y  $H_{\alpha}-H_{\beta}$  en espectros COSY, que, en el caso de valores extremos, restringían los correspondientes ángulos diedros. Con esta información calculó diez estructuras usando el programa DISGEO, cinco que incluían solo la información de NOEs y de enlaces disulfuro y cinco con todas las restricciones. Todas las estructuras eran similares y definían aceptablemente el plegamiento de la proteína. Finalmente, para refinar la estructura y demostrar que era próxima al mínimo de energía, un factor que no contemplaba el programa DISGEO, efectuó una minimización de energía con métodos de mecánica molecular. La estructura final difería poco de la calculada solo con datos de RMN.

Wüthrich presentó la estructura de BUSI IIA en algunas conferencias, incluso antes de su publicación. La reacción fue de incredulidad, sugiriendo que la determinación de la estructura tridimensional se había apoyado en la estructura conocida de proteínas homólogas. Para terminar con las desconfianzas, Robert Huber propuso resolver de forma independiente la estructura de una nueva proteína: en su laboratorio mediante difracción de rayos X y en el de Wüthrich mediante RMN. La farmacéutica Hoechst AG les proporcionó a ambos grandes cantidades de la proteína tendamistat, un inhibidor de la  $\alpha$ -amilasa de 74 residuos. En unos meses Allen Kline consiguió la asignación secuencial del esqueleto de la proteína y determinó la presencia de dos láminas  $\beta$  (26). El cálculo de la estructura tridimensional tardaría un año más (27). El método utilizado para el cálculo de la estructura tridimensional era completamente nuevo. El nuevo método (28), denominado DISMAN y desarrollado por Braun y Gō, utilizaba valores estándar fijos de las longitudes de enlace y de los ángulos de enlace y trataba como variables solo los ángulos diedros. La estructura 3D se obtenía minimizando una función objetivo adecuada, que incluía una suma de cuadrados de las diferencias entre la distancia interatómica "observada experimentalmente" y la distancia correspondiente en el modelo computacional. Usando 401 restricciones de distancia de los efectos NOE (unas 5 por residuo), complementadas con 168 restricciones de distancia derivadas de los enlaces de hidrógeno y de los enlaces disulfuro y con 50 restricciones de ángulos de torsión obtenidas de mediciones de constantes de acoplamiento  $^1H-^1H$  efectuaron 10 cálculos de la estructura del tendamistat. Solo cuatro de los cálculos terminaron con una solución aceptable, de función objetivo suficientemente baja. La raíz cuadrada de la desviación cuadrática media entre las cuatro estructuras era de solo 1,6 Å, por lo que la estructura estaba bien definida. Al artículo de Wüthrich le seguía un artículo de Huber, en el que reportaba la estructura del tendamistat determinada mediante difracción de rayos X (29). El plegamiento global obtenido era prácticamente idéntico al obtenido mediante RMN. Esta similitud,

reforzada por el hecho de que el plegamiento correspondía a un tipo nuevo de barril- $\beta$ , convenció a los críticos de que la RMN realmente era capaz de calcular la estructura tridimensional de proteínas.

La publicación de Wüthrich correspondía a un informe preliminar de la determinación estructural del tendamistat mediante RMN, debido a la necesidad de disponer cuanto antes de datos que permitieran la comparación con los de difracción de rayos X. Wüthrich no se conformó con esto, y en su grupo se continuó trabajando para refinar la estructura inicial. El primer avance fue la asignación completa del espectro, incluyendo las cadenas laterales (30). Durante el año siguiente obtuvieron una serie de datos necesarios para mejorar la definición de la estructura tridimensional. Por un lado, registraron nuevos experimentos NOE, de mayor calidad. Por otro, haciendo uso de valores de constantes de acoplamiento y de intensidades NOE intrarresiduo consiguieron asignar estereoespecíficamente casi la mitad de los 89 centros proquirales. Esto les permitió definir 842 restricciones de distancia (11 por residuo). Además, disponían de unas 100 restricciones debidas a la identificación de los enlaces de hidrógeno y a la medida de constantes de acoplamiento. Con este conjunto de restricciones calcularon nueve estructuras con el programa DISMAN (31). El promedio de la raíz cuadrada de la desviación cuadrática entre pares de esas nueve estructuras era de solo 0,85 Å para el esqueleto polipeptídico y de 1,52 Å para todos los átomos pesados. La definición de la estructura era excelente. Esto permitiría una comparación cuantitativa con los datos de difracción de rayos X. Efectuada ésta (32) la raíz de la desviación cuadrática media era de 1,05 Å para los átomos pesados del esqueleto (N, C $\alpha$  y C'), de 1,25 Å para el esqueleto más las cadenas laterales internas y de 1,84 Å para todos los átomos pesados. Ambas estructuras eran idénticas, salvo pequeñas diferencias en las cadenas laterales periféricas. No solo resultaba posible obtener la estructura 3D de proteínas con RMN, sino que era posible hacerlo con una precisión comparable a la de la difracción de rayos X. Habían pasado siete años entre la propuesta inicial de Wüthrich (18) y la constatación de que la RMN era una alternativa de calidad comparable a la difracción de rayos X.

Otro estudio de esa época que conviene resaltar es el de las metalotioneínas, unas proteínas de bajo peso molecular, ricas en cisteínas, capaces de unir metales pesados para las que no existían estructuras de rayos X. En paralelo con la determinación de la estructura tridimensional del tendamistat, en el grupo de Wüthrich se comenzó el análisis estructural de la metalotioneína-2a (MT-2a) de hígado de conejo. Tras conseguir la asignación secuencial y establecer las uniones cisteína-cadmio determinaron la estructura tridimensional (33). Casi simultáneamente se publicó la estructura tridimensional de la metalotioneína-2 de hígado de rata (MT-2) obtenida mediante cristalografía de rayos X (34). La estructura tenía diferencias importantes con la de disolución, especialmente en los enlaces de coordinación metal-cisteína. Puesto que la muestra estudiada por el grupo de Wüthrich contenía cierta contaminación que había impedido una determinación suficientemente precisa de la estructura tridimensional, decidieron repetir el estudio con una muestra homogénea. Tras la purificación, el resultado obtenido confirmó la estructura obtenida previamente, determinada ahora con una mejor definición (35). Las estructuras primarias de MT-2a y de MT-2 difieren en diez sustituciones y una inserción. Con objeto de dilucidar si esa era la causa de la diferencia de estructuras tridimensionales abordaron también el análisis estructural de la metalotioneína-2 de rata. Primero determinaron las cisteínas unidas a los siete iones de cadmio (36) a partir de espectros de correlación  $^{113}\text{Cd}$ - $^1\text{H}$ . La topología resultó ser idéntica a la de MT-2a. A continuación, determinaron la estructura 3D (37) a partir de datos NOE y de constantes de acoplamiento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ . La estructura resultó ser prácticamente idéntica a la de MT-2a. El origen de la discrepancia entre la estructura en disolución y en el cristal permanecía sin resolverse. La solución

llegaría tres años después, cuando los autores de la determinación de la estructura 3D de MT-2 en el cristal decidieron revisarla. Identificaron la existencia de un error en la determinación inicial y, con datos nuevos de mayor calidad, redeterminaron la estructura tridimensional (38). La estructura resultante estaba en completo acuerdo con las obtenidas en disolución mediante RMN. El "triumfo" de la estructura obtenida por RMN sirvió para reforzar la confianza en el método de Wüthrich para el cálculo de la estructura tridimensional de macromoléculas.

La estrategia de Wüthrich, basada exclusivamente en espectros de protón, presentaba algunas debilidades que limitaban su aplicación a proteínas relativamente pequeñas. Uno de los problemas era el de la resolución de las resonancias de los protones amida y de los  $H_{\alpha}$ . Otro, el hecho de que los NOEs se utilizaran tanto para la asignación secuencial como para obtener la estructura tridimensional. Esto suponía que en los espectros era necesario distinguir los NOEs secuenciales del resto de NOEs, una tarea que no siempre era sencilla. La incorporación del experimento TOCSY, las posibilidades de sintetizar proteínas etiquetadas en  $^{15}N$  y  $^{13}C$  y el desarrollo de la espectroscopía 3D y 4D fueron solventando poco a poco estos problemas. Un primer avance consistió en resolver las frecuencias de resonancia de los protones amida de acuerdo con el desplazamiento químico de  $^{15}N$  de los nitrógenos unidos a ellos mediante experimentos 3D  $^{15}N, ^1H$ -HMQC-TOCSY y 3D  $^{15}N, ^1H$ -HMQC-NOESY (39). El avance fundamental lo realizó el grupo de Ad Bax, proponiendo una serie de experimentos 3D heteronucleares que involucran al  $^{13}C$  y al  $^{15}N$  para la asignación secuencial (40). La nueva estrategia de asignación se basaba en el hecho de que los nitrógenos de las amidas presentan acoplamiento escalares tanto con el  $C_{\alpha}$  de su mismo residuo como con el  $C_{\alpha}$  del residuo anterior en la secuencia. La eficiencia del método propuesto la demostraron con la asignación completa de las resonancias de los protones, carbonos y nitrógenos del esqueleto de la calmodulina, una proteína de 148 residuos. Posteriormente se mejoraron las secuencias de pulsos, por ejemplo, con la inclusión de pulsos de gradiente de campo, y se incluyeron nuevas secuencias de pulsos. De especial valor fue la inclusión de los  $C_{\beta}$  en el proceso de asignación (41). La información sobre los desplazamientos químicos de los carbonos  $C_{\beta}$  es especialmente valiosa, ya que son característicos de los diferentes tipos de aminoácidos y, por lo tanto, permiten posicionar un tramo de aminoácidos conectados secuencialmente dentro de la secuencia primaria de la proteína. En unos pocos años quedó establecido un conjunto canónico de experimentos de triple resonancia para la asignación secuencial (42). También los métodos de cálculo de la estructura tridimensional evolucionaron desde el uso inicial de la matriz métrica a métodos de dinámica molecular (43-45).

Aunque tanto el método de asignación secuencial como el de cálculo hayan variado, se conserva el esquema propuesto por Wüthrich, que se puede descomponer en tres pasos: identificación de sistemas de espín correspondientes a dos residuos consecutivos; posicionamiento de grupos de sistemas de espín consecutivos en la secuencia de la proteína; uso de los efectos NOE  $^1H$ - $^1H$ , si acaso complementados con otra información derivada de los espectros (enlaces de hidrógeno, enlaces disulfuro, constantes de acoplamiento, acoplamiento dipolares residuales, desplazamientos químicos, etc.), para determinar la estructura 3D.

Como recompensa al inmenso trabajo realizado, Kurt Wüthrich recibiría 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*".

## Referencias

1. M. Saunders, A. Wishnia, J.G. Kirkwood, *The Nuclear Magnetic Resonance Spectrum of Ribonuclease*, J. Am. Chem. Soc., 79, 3289-3290, 1957.
2. O. Jardetzky, C.D. Jardetzky, *An Interpretation of the Proton Magnetic Resonance Spectrum of Ribonuclease*, J. Am. Chem. Soc., 79, 5322-5323, 1957.
3. A. Kowalsky, *Nuclear Magnetic Resonance Studies of Proteins*, J. Biol. Chem., 237, 1807-1819, 1962.
4. M. Mandel, *Proton Magnetic Resonance Spectra of Some Proteins. I. Ribonuclease, Oxidized Ribonuclease, Lysozyme, and Cytochrome c*, J. Biol. Chem., 240, 1586-1592, 1965.
5. J.H. Bradbury, H.A. Scheraga, *Structural Studies of Ribonuclease. XXIV. The Application of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy to Distinguish between the Histidine Residues of Ribonuclease*, J. Am. Chem. Soc., 88, 4240-4246, 1966.
6. D.H. Meadows, J.L. Markley, J.S. Cohen, O. Jardetzky, *Nuclear Magnetic Resonance Studies of the Structure and Binding Sites of Enzymes, I. Histidine Residues*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 58, 1307-1313, 1967.
7. D.H. Meadows, O. Jardetzky, R.M. Epand, H.H. Rüterjans, H.A. Scheraga, *Assignment of the Histidine Peaks in the Nuclear Magnetic Resonance Spectrum of Ribonuclease*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 766-772, 1968.
8. A. Kowalsky, *Nuclear Magnetic Resonance Studies of Cytochrome c. Possible Electron Delocalization*, Biochemistry, 4, 2382-2388, 1965.
9. K. Wüthrich, *Structural Studies of Hemes and Hemoproteins by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Struct. Bond., 8, 53-121, 1970.
10. K. Wüthrich, A. Tun-Kyi, R. Schwyzer, *Manifestation in the <sup>13</sup>C-NMR Spectra of Two Different Molecular Conformations of a Cyclic Pentapeptide*, FEBS Lett., 25, 104-108, 1972.
11. K. Wüthrich, G. Wagner, *NMR Investigations of the Dynamics of the Aromatic Amino Acid Residues in the Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor*, FEBS Lett., 50, 265-268, 1975.
12. R.M. Keller, K. Wüthrich, *Assignment of the Heme c Resonances in the 360 MHz <sup>1</sup>H NMR Spectra of Cytochrome c*, Biochim. Biophys. Acta, 533, 195-208, 1978.
13. S.L. Gordon, K. Wüthrich, *Transient Proton-Proton Overhauser Effects in Horse Ferrocyclochrome c*, J. Am. Chem. Soc., 100, 7094-7096, 1978.
14. G. Wagner, K. Wüthrich, *Truncated Driven Nuclear Overhauser Effect (TOE). A New Technique for Studies of Selective <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H Overhauser Effects in the Presence of Spin Diffusion*, J. Magn. Reson., 33, 675-680, 1979.
15. A. Dubs, G. Wagner, K. Wüthrich, *Individual Assignments of Amide Proton Resonances in the Proton NMR Spectrum of the Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor*, Biochim. Biophys. Acta, 577, 177-194, 1979.
16. G. Wagner, K. Wüthrich, *Sequential Resonance Assignments in Protein <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Spectra: Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor*, J. Mol. Biol., 155, 347-366, 1982.
17. M. Billeter, W. Braun, K. Wüthrich, *Sequential Resonance Assignments in Protein <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Spectra: Computation of Sterically Allowed Proton-Proton Distances and Statistical Analysis of Proton-Proton Distances in Single Crystal Protein Conformations*, J. Mol. Biol., 155, 321-346, 1982.

18. K. Wüthrich, G. Wider, G. Wagner, W. Braun, *Sequential Resonance Assignments as a Basis for Determination of Spatial Protein Structures by High Resolution Proton Nuclear Magnetic Resonance*, *J. Mol. Biol.*, 155, 311-319, 1982.
19. W. Braun, C. Bösch, L.R. Brown, N. Gö, K. Wüthrich, *Combined Use of Proton-Proton Overhauser Enhancements and a Distance Geometry Algorithm for Determination of Polypeptide Conformations*, *Biochim. Biophys. Acta*, 667, 377-396, 1981.
20. L.R. Brown, W. Braun, A. Kumar, K. Wüthrich, *High Resolution Nuclear Magnetic Resonance Studies of the Conformation and Orientation of Melittin Bound to a Lipid-Water Interface*, *Biophys. J.*, 37, 319-328, 1982.
21. W. Braun, G. Wider, K.H. Lee, K. Wüthrich, *Conformation of Glucagon in a Lipid-Water Interphase by  $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance*, *J. Mol. Biol.*, 169, 921-948, 1983.
22. T.H. Havel, K. Wüthrich, *A Distance Geometry Program for Determining the Structures of Small Proteins and other Macromolecules from Nuclear Magnetic Resonance Measurements of Intramolecular  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  Proximities in Solution*, *Bull. Math. Biol.*, 46, 673-698, 1984.
23. T.F. Havel, K. Wüthrich, *An Evaluation of the Combined Use of Nuclear Magnetic Resonance and Distance Geometry for the Determination of Protein Conformations in Solution*, *J. Mol. Biol.*, 182, 281-294, 1984.
24. M. Williamson, T.F. Havel, K. Wüthrich, *Solution Conformation of Proteinase Inhibitor IIA from Bull Seminal Plasma by  $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance and Distance Geometry*, *J. Mol. Biol.*, 182, 295-315, 1984.
25. P. Štřop, G. Wider, K. Wüthrich, *Assignment of the  $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectrum of the Proteinase Inhibitor IIA from Bull Seminal Plasma by Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance at 500 MHz*, *J. Mol. Biol.*, 166, 641-667, 1983.
26. A.D. Kline, K. Wüthrich, *Secondary Structure of the  $\alpha$ -Amylase Polypeptide Inhibitor Tendamistat from *Streptomyces Tendae* Determined in Solution by  $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance*, *J. Mol. Biol.*, 183, 503-507, 1985.
27. A.D. Kline, W. Braun, K. Wüthrich, *Studies by  $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance and Distance Geometry of the Solution Conformation of the  $\alpha$ -Amylase Inhibitor Tendamistat*, *J. Mol. Biol.*, 189, 377-382, 1986.
28. W. Braun, N. Gö, *Calculation of Protein Conformations by Proton-Proton Distance Constraints: A New Efficient Algorithm*, *J. Mol. Biol.* 186, 611-626, 1985.
29. J.W. Pflugrath, G. Wiegand, R. Huber, L. Vértesy, *Crystal Structure Determination, Refinement and the Molecular Model of the  $\alpha$ -Amylase Inhibitor Hoe-467A*, *J. Mol. Biol.*, 189, 383-386, 1986.
30. A.D. Kline, K. Wüthrich, *Complete Sequence-Specific  $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance Assignments for the  $\alpha$ -Amylase Polypeptide Inhibitor Tendamistat from *Streptomyces Tendae**, *J. Mol. Biol.*, 192, 869-890, 1986.
31. A.D. Kline, W. Braun, K. Wüthrich, *Determination of the Complete Three-Dimensional Structure of the  $\alpha$ -Amylase Inhibitor Tendamistat in Aqueous Solution by Nuclear Magnetic Resonance and Distance Geometry*, *J. Mol. Biol.*, 204, 675-724, 1988.
32. M. Billeter, A.D. Kline, W. Braun, R. Huber, K. Wüthrich, *Comparison of the High-Resolution Structures of the  $\alpha$ -Amylase Inhibitor Tendamistat Determined by Nuclear Magnetic Resonance in Solution and by X-Ray Diffraction in Single Crystals*, *J. Mol. Biol.*, 206, 677-687, 1989.

33. W. Braun, G. Wagner, E. Wörgötter, M. Vašak, J.H.R. Kägi, K. Wüthrich, *Polypeptide Fold in the Two Metal Clusters of Metallothionein-2 by Nuclear Magnetic Resonance in Solution*, *J. Mol. Biol.*, 187, 125-129, 1986.
34. W.F. Furey, A.H. Robbins, L.L. Clancy, D.R. Winge, B.C. Wang, C.D. Stout, *Crystal Structure of Cd,Zn Metallothionein*, *Science*, 231 (4739), 704-710, 1986.
35. A. Arseniev, P. Schultze, E. Wörgötter, W. Braun, G. Wagner, M. Vašak, J.H.R. Kägi, K. Wüthrich, *Three Dimensional Structure of Rabbit Liver [Cd<sub>7</sub>] Metallothionein-2a in Aqueous Solution Determined by Nuclear Magnetic Resonance*, *J. Mol. Biol.* 201, 637-657, 1988.
36. M. Vašak, E. Wörgötter, G. Wagner, J.H.R. Kägi, K. Wüthrich, *Metal Co-ordination in Rat Liver Metallothionein-2 Prepared With or Without Reconstitution of the Metal Clusters, and Comparison with Rabbit Liver Metallothionein-2*, *J. Mol. Biol.*, 196, 711-719, 1987.
37. P. Schultze, E. Wörgötter, W. Braun, G. Wagner, M. Vašak, J.H.R. Kägi, K. Wüthrich, *Conformation of [Cd<sub>7</sub>]-Metallothionein-2 from Rat Liver in Aqueous Solution Determined by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, *J. Mol. Biol.*, 203, 251-268, 1988.
38. A.H. Robbins, D.E. McRee, M. Williamson, S.A. Collett, N.H. Xoung, W.F. Furey, B.C. Wang, C.D. Stout, *Refined Crystal Structure of Cd, Zn Metallothionein at 2.0 Å Resolution*, *J. Mol. Biol.*, 221, 1269-1293, 1991.
39. S.W. Fesik, E.R.P. Zuiderweg, *Heteronuclear Three-Dimensional NMR Spectroscopy. A Strategy for the Simplification of Homonuclear Two-Dimensional NMR Spectra*, *J. Magn. Reson.*, 78, 588-593, 1988.
40. M. Ikura, L.E. Kay, A. Bax, *A Novel Approach for Sequential Assignment of Proton, Carbon-13, and Nitrogen-15 Spectra of Larger Proteins: Heteronuclear Triple-Resonance Three-Dimensional NMR Spectroscopy. Application to Calmodulin*, *Biochemistry*, 29, 4659-4667, 1990.
41. S. Grzesiek, A. Bax, *Correlating Backbone Amide and Side Chain Resonances in Larger Proteins by Multiple Relayed Triple Resonance NMR*, *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 6291-6293, 1992.
42. M. Sattler, J. Schleucher, C. Griesinger, *Heteronuclear Multidimensional NMR Experiments for the Structure Determination of Proteins in Solution Employing Pulsed Field Gradients*, *Prog. Nucl. Mag. Res.*, 34, 93-158, 1999.
43. P. Güntert, C. Mumenthaler, K. Wüthrich, *Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA*, *J. Mol. Biol.*, 273, 283-298, 1997.
44. C.D. Schwieters, J.J. Kuszewski, N. Tjandra, G.M. Clore, *The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package*, *J. Magn. Reson.*, 160, 65-73, 2003.
45. P. Güntert, *Automated NMR protein structure calculation with CYANA*, *Meth. Mol. Biol.*, 278, 353-378, 2004.