

Implementación de las técnicas de RMN y cristalografía de macromoléculas para la caracterización estructural de proteínas de interés biomédico

Implementation of NMR and macromolecular crystallography techniques for structural characterization of proteins of biomedical interest

Silvia Arce-Solano¹, Erick Hernández-Carvajal²

Arce-Solano, S; Hernández-Carvajal, E. Implementación de las técnicas de RMN y cristalografía de macromoléculas para la caracterización estructural de proteínas de interés biomédico. *Tecnología en Marcha*. Especial 2019. 25 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Pág 47-55.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4627>



- 1 Investigadora Instructora. Ing. Licenciada en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), Escuela de Biología, Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: smarce@tec.ac.cr
 <https://orcid.org/0000-0003-4357-3661>
- 2 Investigador Asociado. Doctor en Biomedicina. Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), Escuela de Biología, Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: erhernandez@tec.ac.cr
 <https://orcid.org/0000-0002-5585-9125>

Palabras clave

Macromoléculas; RMN; cristalización; difracción de rayos X; cristalografía; estructura 3D de proteínas; FVIII; trombina; fosfolipasas; metaloproteasas.

Resumen

La implementación de novedosas técnicas biofísicas para análisis de proteínas a escala atómica, tales como la resonancia magnética nuclear de proteínas (RMN) y la cristalografía de rayos X, permiten el estudio de los mecanismos moleculares de interacción entre proteínas de interés y, -en algunos casos-, permite explorar mecanismos alternativos para el diseño de nuevos fármacos. Nuestro grupo ha desarrollado dos líneas de investigación buscando implementar y consolidar dichas técnicas biofísicas, con el objetivo de comprender mejor las interacciones entre sustratos, -como el factor VIII y el receptor de plaquetas PAR1- con la trombina, en los procesos de coagulación sanguínea; y, por otra parte, conocer mejor la actividad funcional de algunas proteínas provenientes de venenos de serpientes. La interacción de regiones conectoras del FVIII humano con la trombina fue estudiada utilizando la técnica de RMN, a través de ensayos mono, bi y tri-dimensionales, donde los conectores del FVIII humano fueron marcados con los isótopos ^1H , ^{13}C y ^{15}N empleando sobreexpresión heteróloga en cepas de *Escherichia coli*. Mediante la técnica de cristalografía de rayos X se ha logrado obtener cristales a partir de la generación de complejos de las proteínas recombinantes humanas con la trombina, y se han desarrollado una serie de mutantes del FVIII y PAR1, para favorecer complejos intermedios más estables con la trombina. Por último, se ha trabajado con una metaloproteinasa del veneno de la serpiente *Crotalus simus* y una fosfolipasa de *Botriechis schelegelii*. De esta última se obtuvo una estructura 3D a una alta resolución ($\sim 2.5 \text{ \AA}$).

Keywords

Macromolecules; NMR; crystallization; X-ray diffraction; crystallography; protein 3D structure; FVIII; thrombin; phospholipases; metalloproteases.

Abstract

The implementation of cutting-edge biophysics techniques to analyze proteins at atomic-scale, such as nuclear magnetic resonance (NMR) and X-ray crystallography, allows the study of molecular interaction's mechanisms between proteins of interest and, -in some cases-, allows exploring alternative mechanisms for new drug design. Our research group has developed two lines of research seeking to implement and consolidate the biophysical techniques mentioned above, with the aim of better understanding the interactions between substrates, such as factor VIII and platelet receptor PAR1, with thrombin, in the processes of blood coagulation; and on the other hand, to better understand the functional activity of some proteins from snake venoms. The interaction between connectors of the human FVIII with thrombin was studied through NMR mono-, bi- and tri-dimensional assays. For these experiments, the human FVIII connectors were labelled with ^1H , ^{13}C and ^{15}N isotopes using heterologous overexpression in *Escherichia coli* strains. Through X-ray crystallography technique, crystals of complexes between recombinant proteins and thrombin have been grown, and a series of FVIII and PAR1 mutants have been developed to favor more stable intermediate complexes with thrombin. On the other hand, a metalloproteinase from the snake venom of *Crotalus simus* and a phospholipase from *Botriechis schelegelii* have also been analyzed. From the latter, a 3D structure was obtained at a high resolution ($\sim 2.5 \text{ \AA}$).

¿Qué es la Biología Estructural de proteínas?

La Biología Estructural de proteínas se basa en el principio de que la función de una proteína depende, de manera crítica, de la estructura tridimensional de la misma. Es por este motivo que, para comprender el funcionamiento y el mecanismo de acción de una proteína, se estudia su estructura tridimensional. Durante las últimas dos décadas, dos de las técnicas mayormente utilizadas para la determinación de estructuras de proteínas han sido la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y la cristalografía de rayos X [1].

La técnica de RMN se basa en que los núcleos atómicos al ser expuestos a un campo magnético externo pueden absorber energía en forma de radiación electromagnética a una determinada frecuencia, según el tipo de núcleo y su entorno químico. Esto va a provocar que los núcleos se alineen al campo magnético externo bajo una diferente frecuencia de resonancia, la cual proporciona información detallada de la estructura molecular en la que los átomos se encuentran [2], [3]. Esta técnica permite obtener información de la estructura y propiedades dinámicas de las proteínas en solución, e incluso ayuda a determinar la estructura tridimensional en proteínas que no son cristalizables. Núcleos como el ^1H , el ^{13}C y el ^{15}N son muy utilizados en la técnica de RMN, debido a que su número atómico impar les permite tener un momento magnético que favorece la resonancia en un campo magnético.

Por otra parte, la cristalografía de rayos X es una técnica que permite el estudio del ordenamiento de los átomos en diferentes estructuras cristalinas por la manera en que estas dispersan un haz de rayos X; fenómeno descubierto por el alemán von Laue en 1912 [4]. Requiere de una proteína purificada homogéneamente en una solución soluble para, a partir de esta, obtener un cristal formado mayormente por proteína. Dicho cristal es expuesto a un haz de rayos X y como resultado se obtienen patrones de difracción que son procesados para, en primer lugar, obtener información sobre la simetría del empaquetamiento del cristal y el tamaño de la celda unidad que se repite a lo largo del cristal. Posteriormente, las intensidades de los puntos obtenidos en el patrón de difracción dan información que permite determinar algunos factores estructurales que se utilizan para calcular un mapa de densidad electrónica [5] y finalmente modelar la estructura de la proteína.

Biología Estructural de Macromoléculas en Costa Rica

Historia del Laboratorio de Biología Estructural de Proteínas

El grupo de Biología Estructural de Proteínas es parte del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC), fue fundado por el Dr. Erick Hernández-Carvajal en enero del 2014 tras la aprobación del proyecto “Expresión heteróloga, purificación, caracterización y cristalización de factores proteicos que participan en los procesos de coagulación sanguínea”, que permitió la continuación de las líneas de investigación que desarrolló durante sus estudios de doctorado en Biomedicina en el Instituto de Investigación Biomédica-Sant Pau (IIB-Sant Pau) del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau en Barcelona, España.

Las labores iniciaron en el Laboratorio de Biología Molecular en las antiguas instalaciones del CIB (edificio G7). Durante el 2014 se contó con cuatro asistentes estudiantiles y para el segundo semestre del primer año, se desarrolló el primer trabajo final de graduación de bachillerato universitario enmarcado dentro del proyecto vigente.

Empezando el 2015, se estrenaron las instalaciones actuales del CIB, las cuales permitieron crecer en espacio y equipos. Esto ha permitido al grupo desarrollar cinco proyectos nuevos de investigación, seis trabajos finales de graduación, dos proyectos estudiantiles de investigación

y realizar un curso de capacitación hasta la fecha. En el año 2016, se logró la contratación de una segunda investigadora dentro del grupo de trabajo, la Ing. Silvia Arce-Solano, quien previamente había sido asistente estudiantil desde el inicio de los proyectos y había realizado su trabajo final de graduación enmarcado dentro de los proyectos, además, posteriormente, ella realizó su tesis de licenciatura dentro de nuestras líneas de trabajo.

A lo largo de los años, también se ha dado un crecimiento en cuanto a la cantidad de asistentes estudiantiles que han tenido la oportunidad de colaborar en los proyectos de investigación y ampliar su conocimiento en el área de la Biología Estructural de Proteínas, actualmente suman 18 estudiantes de grado de Ingeniería en Biotecnología. Muchos de estos estudiantes ya son profesionales, y algunos de ellos han tenido la oportunidad de realizar sus trabajos finales de graduación en el mismo laboratorio como tal, e incluso en el extranjero (ej. Laboratorio Biomolecular de Resonancia Magnética Nuclear (Bio-RMN) del Instituto Científico del Hospital de San Raffaele (Milán, Italia), Instituto de Investigación Biomédica August Pi i Sunyer (IDIBAPS) (Barcelona, España), y el Instituto de Investigación Biomédica-Sant Pau (IIB-Sant Pau) (Barcelona, España)), así como en instituciones nacionales de prestigio como el Instituto Clodomiro Picado (ICP) de la Universidad de Costa Rica, gracias a los contactos del grupo de investigación con dichas instituciones.

Actualmente, el grupo está conformado por dos investigadores y seis asistentes estudiantiles; se han desarrollado cinco proyectos, de los cuales dos están en curso (VIE 1510103: “Estudios estructurales de proteínas provenientes de venenos de serpientes de importancia biomédica para la búsqueda de posibles moléculas terapéuticas inhibitorias mediante difracción de rayos X” y FEES 1510108: “Bases moleculares de la interacción y la degradación de la membrana basal vascular por metaloproteinasas hemorrágicas de venenos de serpiente”); y han contado con la colaboración de múltiples instituciones nacionales: el Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA), el Instituto Clodomiro Picado (ICP) y la Escuela de Química, de la Universidad de Costa Rica; el Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología de Proteínas (LBBP) de la Universidad Nacional de Costa Rica; el Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CeniBiot) del Centro Nacional de Alta Tecnología (CENAT); y la Escuela de Física del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Asimismo, en todos los proyectos se ha contado con la cooperación internacional por parte del Dr. Pablo Fuentes-Prior, de la Unidad Bases Moleculares de las Enfermedades del Instituto de Investigación Biomédica-Sant Pau (IIB-Sant Pau) de Barcelona, España.

Principales logros

Implementación de ensayos de resonancia magnética nuclear (RMN) de proteínas en solución

Uno de los logros más importantes fue realizar los primeros ensayos de Resonancia Magnética Nuclear de proteínas en Costa Rica, gracias al trabajo conjunto con el Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA), de la Universidad de Costa Rica (UCR).

A pesar de que el equipo de espectrometría de resonancia magnética nuclear con el que cuenta el CIPRONA (Bruker Ascend 600 MHz) fue adquirido desde el 2011, no es hasta los ensayos realizados durante el segundo semestre del 2014, que el equipo es utilizado en medición de macromoléculas como las proteínas para la obtención de datos en una, dos y tres dimensiones, empleando una sonda especial para la detección de la triple resonancia. Anterior a esto, se había utilizado únicamente con moléculas orgánicas pequeñas, y para ensayos de una y dos dimensiones únicamente.

En los ensayos de RMN de macromoléculas en solución se trabajó con regiones conectoras inter-dominio del factor VIII humano que participa en los procesos de coagulación sanguínea. Estos conectores se proponen como las regiones que interactúan con la proteasa serínica, trombina, una de las principales proteínas implicadas en el proceso de formación del coágulo sanguíneo. Sin embargo, los mecanismos moleculares de esta interacción se desconocen, por ello, los ensayos de RMN se vuelven fundamentales para comprender de mejor manera las interacciones de proteínas solución. Los ensayos de RMN mono, bi y tri-dimensionales permitieron observar y determinar la interacción entre la trombina y los fragmentos del FVIII en estudio (figura 1). Para estos los experimentos se debió sobreexpresar heterológicamente los conectores del FVIII humano marcado con los isótopos ^1H , ^{13}C y el ^{15}N en cepas de *Escherichia coli* en medio de cultivo especiales.

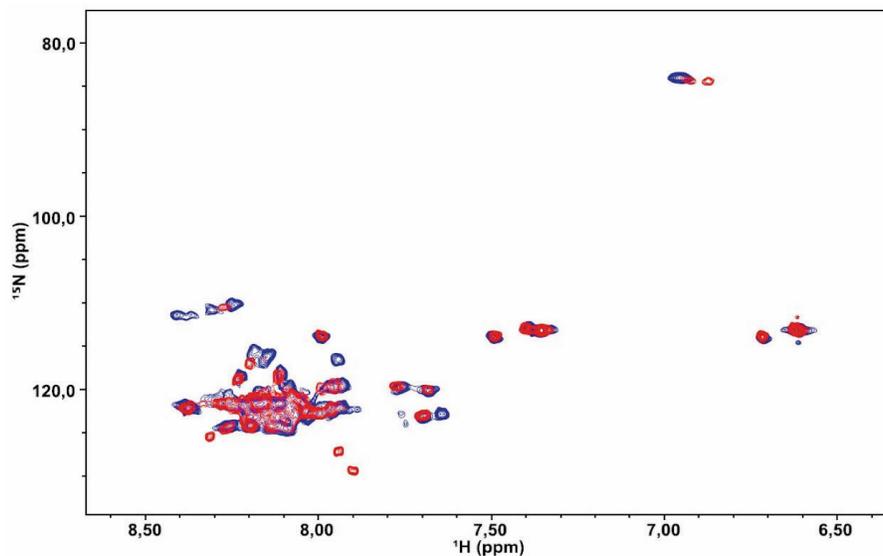


Figura 1. Superposición de los espectros HSQC ^1H - ^{15}N del fragmento FVIIIa3- ^{15}N libre y en presencia de trombina. Se representa de color azul el espectro de resonancia del fragmento libre y en color rojo el espectro de resonancia del complejo.

Apoyo en el desarrollo de capacidades a nivel centroamericano con cooperación internacional

Durante el 2015, el grupo de investigación tuvo la oportunidad de organizar un curso internacional teórico-práctico financiado por la Universidad de las Naciones Unidas dentro del Programa de Biotecnología para América Latina y el Caribe (UNU-BIOLAC) y por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del TEC; con el apoyo del Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) y del Programa de Investigación en Bioingeniería del TEC. El curso “Aplicaciones de PCR cuantitativo y técnicas de expresión heteróloga de proteínas como enfoques moleculares para la comprensión de mecanismos biológicos” contó con la participación de doce estudiantes de todos los países de Centroamérica y República Dominicana, seleccionados de un total de 120 postulantes de toda América Latina; más ocho estudiantes de Costa Rica, para un total de veinte participantes (figura 2). En este curso, los participantes recibieron conferencias magistrales (figura 2A) y sesiones de laboratorio (figura 2B) en las que se contó con la participación de profesores invitados internacionales: la Dra. Elena de Mendoza-Barberà, investigadora en el Departamento de Microbiología, Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona (España); la Dra. María Ángeles Corral-Rodríguez, investigadora en

el Laboratorio Biomolecular de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) del Instituto Científico del Hospital de San Raffaele (Milán, Italia) (figura 2A); y con el Dr. Fabián Arenas-Ríos, investigador en el Instituto de Investigación Biomédica August Pi i Sunyer (IDIBAPS) (Barcelona, España) (figura 2B); así como el Dr. Erick Hernández-Carvajal, investigador del Centro de Investigación en Biotecnología del TEC.



Figura 2. Curso internacional de aplicaciones de PCR cuantitativo y técnicas de expresión heteróloga de proteínas como enfoques moleculares para la comprensión de mecanismos biológicos. A) Conferencia magistral a cargo de la Dra. María Ángeles Corral-Rodríguez. B) Sesión de laboratorio a cargo del Dr. Fabián Arenas-Ríos. C) Foto grupal con los estudiantes, profesores y organizadores del curso.

Investigación conjunta con institutos de investigación nacional e internacional

Experiencias exitosas con el ICP

En Costa Rica se ha hecho un esfuerzo considerable durante las últimas décadas, por estudiar y atender los envenenamientos por mordeduras de serpientes. Este es un tema muy importante a nivel nacional debido a la biodiversidad de serpientes con la que cuenta el país, siendo las regiones rurales las que normalmente son más afectadas y en donde, además, los índices de desarrollo humano son comúnmente más bajos y el acceso a los centros de salud es más limitado debido a las distancias, los caminos de esas zonas y el bajo número de centros de salud disponibles [6]. Una respuesta a esta iniciativa fue la creación del Instituto Clodomiro Picado en 1970, asociado a la Universidad de Costa Rica (UCR), que se ha encargado de mapear las especies de serpientes en el país, estudiar sus venenos y generar sueros antiofídicos disponibles para la población en general.

Los venenos de las serpientes se caracterizan por una enorme complejidad bioquímica y están compuestos por una gran cantidad de proteínas como proteasas serínicas, metaloproteasas, L-aminoácido oxidasas, fosfolipasas, desintegrinas, lectinas tipo C, miotoxinas y proteínas CRISP [7]. Comprender mejor la relación entre estructura y función de proteínas clave en los venenos de las serpientes, así como conocer los mecanismos de inhibición de estas, es importante para el futuro desarrollo de estrategias farmacológicas complementarias para el tratamiento en casos de mordeduras de serpientes, traducándose en un beneficio para los pacientes disminuyendo así las discapacidades, la morbilidad y la mortalidad.

Es por lo expuesto anteriormente, que desde el año 2016 hemos iniciado las investigaciones en conjunto con el ICP, en búsqueda de caracterizar a nivel estructural proteínas de interés en los venenos de las serpientes y sumar esta información a la caracterización bioquímica que se realiza por parte de dicho instituto.

Ensayos de cristalografía de proteínas en Costa Rica con vinculación internacional

A pesar de que sólo se necesitan unos pocos cristales de buena calidad para resolver una estructura por medio de la cristalografía de rayos X, uno de los cuellos de botella de esta técnica es obtener cristales de alta calidad, dado que al ser la cristalización un proceso pluriparamétrico se dificulta determinar las condiciones ideales para que una proteína cristalice de forma ordenada [8]. La obtención de cristales de alta calidad es fundamental para que la información de difracción colectada sea fiable para la resolución de la estructura tridimensional de la proteína, por lo que la búsqueda de las condiciones de cristalización adecuadas es fundamental. En este sentido, se ha trabajado con complejos proteicos de trombina con diferentes fragmentos del factor VIII humano de la coagulación sanguínea (conectores interdominio $\alpha 1$ y $\alpha 3$, y mutantes de estos) y con el receptor de plaquetas PAR1; así como con variantes de una metaloproteinasa de la serpiente *Crotalus simus* y una fosfolipasa tipo A_2 de la serpiente *Botriechis schelegelli*.

La estrategia de cristalización que se ha empleado con las proteínas mencionadas ha sido la difusión de vapor, específicamente la modalidad de gota colgante (*hanging-drop*). Se han estudiado cerca de 628 condiciones empleando los kits de cristalización: *JCSG-plusTM*, *Morpheus@*, *Morpheus@ II*, *PACTpremierTM*, *ProPlexTM*, *Structure Screen I*, *Structure Screen II*, *Structure Screen 3D*; todos de la empresa *Molecular Dimensions*.

Para visualizar estructuras a nivel atómico, es requerido utilizar radiaciones electromagnéticas que tengan longitudes de onda similares a las distancias de los enlaces atómicos (cercas a 1 Å o 0.1 nm), las cuales pueden conseguirse con la radiación X [9]. Los rayos X se producen cuando un haz de electrones acelerados a alto voltaje, chocan con un blanco metálico que provoca que sean rápidamente desacelerados por la colisión [10]. Un sincrotrón es un acelerador de partículas en forma de anillo donde los electrones son acelerados radialmente, dentro de un campo magnético [11]. Estas instalaciones permiten generar rayos X altamente energéticos y colimados para la generación de datos muy detallados de muestras de diferentes disciplinas. Algunas de las numerosas ventajas de utilizar radiación sincrotrónica son la rapidez en la colecta de datos al procesar más cristales por unidad de tiempo, la posibilidad de utilizar cristales más pequeños que con fuentes convencionales de rayos X, y permitir realizar mediciones en múltiples longitudes de onda en momentos diferentes según la necesidad [12].

Gracias a la cooperación internacional con el Instituto de Investigación Biomédica-Sant Pau (IIB-Sant Pau), se ha logrado el acceso al sincrotrón ALBA en Barcelona, España. El acceso a este sincrotrón ha permitido colectar datos cristalográficos de cerca de 150 cristales, de diferentes complejos proteicos, así como proteínas obtenidas de venenos de serpientes. Esto ha permitido obtener cerca de veinte conjuntos de datos cristalográficos de mediana calidad.

Posteriormente, a partir de datos cristalográficos de alta calidad se ha logrado resolver la estructura de una fosfolipasa de veneno de la serpiente *Botriechis schlegelii* (bocaracá tica) a alta resolución ($\sim 2.5 \text{ \AA}$) no reportada previamente (figura 3). Dichos datos se encuentran en proceso de publicación en conjunto con el Instituto Clodomiro Picado. Estos ensayos cristalográficos ponen a la vanguardia a Costa Rica como el primer país en Centroamérica en implementar la cristalografía de proteínas, siguiendo los esfuerzos de países Latinoamericanos con mayores recursos económicos y acercándonos al avance científico y tecnológico de países de primer mundo.

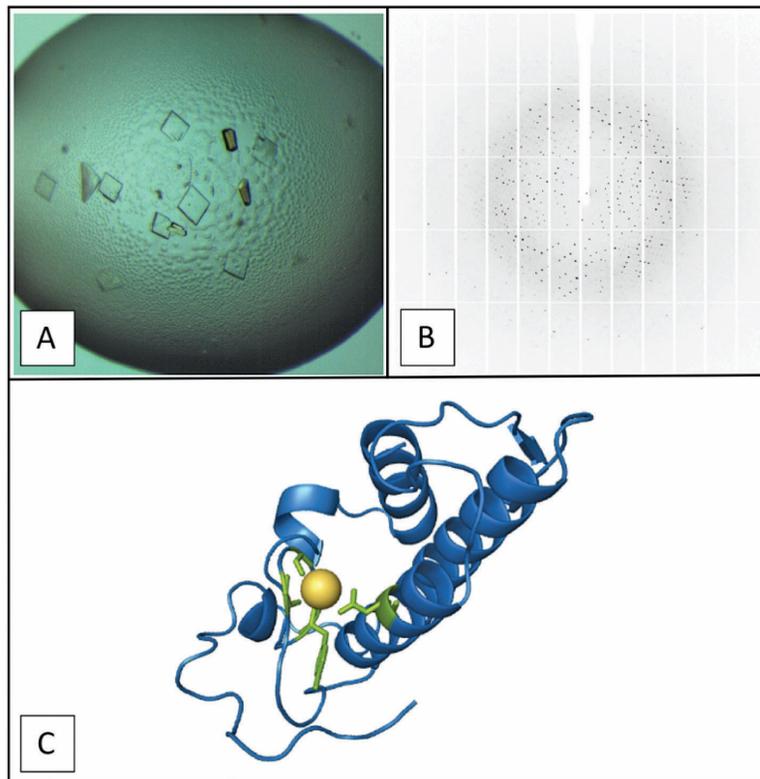


Figura 3. Cristalografía de rayos X de macromoléculas proteicas. A. Cristales obtenidos a partir de la fosfolipasa A_2 purificada del veneno de la serpiente *Botriechis schelegelli*. B. Imagen de un espectro de difracción de rayos X obtenido a partir de uno de los cristales de la fosfolipasa A_2 . C. Representación gráfica de la estructura 3D obtenida de la fosfolipasa A_2 a una resolución $\sim 2.5 \text{ \AA}$. Se resalta en *sticks* verdes los residuos que participan en la coordinación del ión calcio, característico de las fosfolipasas tipo A_2 catalíticamente activas, así como el ión calcio representado con una esfera amarilla.

Conclusiones

Por medio del grupo de Biología Estructural de Proteínas en el CIB y del apoyo del Instituto Tecnológico de Costa Rica para el desarrollo de proyectos de investigación, se han logrado implementar -por primera vez en Costa Rica- técnicas biofísicas utilizadas a nivel mundial para el estudio de los mecanismos moleculares de proteínas de interés. Estos proyectos han permitido albergar el entrenamiento de dieciocho estudiantes de la carrera de Ingeniería en Biotecnología, favoreciendo sus habilidades en el laboratorio y aprendizaje en el área de la Biología Estructural de Proteínas, permitiendo vincular la docencia con la investigación

como respuesta al esfuerzo de financiamiento de investigación y asegurando la transferencia del conocimiento a los estudiantes, a la industria, y a la sociedad. Por último, se espera próximamente reportar la primera estructura cristalina resuelta en Costa Rica, de una fosfolipasa del veneno de la serpiente bocaracá tica (*Botriechis schlegelii*) no reportada anteriormente. Este logro, colocará al TEC y a Costa Rica a la vanguardia en el área de la Biología Estructural en la región.

Referencias

- [1] M. Kainosho *et al.*, "Optimal isotope labelling for NMR protein structure determinations," *Nature*, vol. 440, pp. 52-57, 2005, DOI: <https://doi.org/10.1038/nature04525>
- [2] G. Rule and T. Hitchens, "Fundamentals of protein NMR spectroscopy" Springer, Netherlands, pp. 542, 2006.
- [3] N. Jacobsen, "NMR Spectroscopy explained: Simplified theory, applications and examples for organic chemistry and structural biology," Wiley, New Jersey, USA, pp. 685, 2007.
- [4] W. Bragg, "British achievements in X-ray crystallography," *Science*, vol. 131, pp. 1870-1874, 1960, DOI: <https://doi.org/10.1126/science.131.3417.1870>
- [5] M.S. Smyth and J.H.J. Martin, "X ray crystallography," *Mol Pathol*, vol. 58, pp. 8-14, 2000, DOI: <http://doi.org/10.1136/mp.53.1.8>
- [6] J.M. Gutiérrez, "Envenenamiento por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional," *Bol. Malariol. y Sal. Amb.*, vol. 52, no. 1, pp. 1-16, 2011.
- [7] J.J. Calvete, "Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming," *Expert Rev Proteomic*, vol. 8, no. 6, pp. 739-58, 2011, DOI: <https://doi.org/10.1586/epr.11.61>
- [8] N.E. Chayen and E. Saridakis, "Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal," *Nature Methods*, vol. 5, pp. 147-153, 2008, DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.203>
- [9] M.W. Parker, "Protein structure from X-ray diffraction," *J Biol Phys*, vol. 29, no. 4, pp. 341-362, 2003, DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1027310719146>.
- [10] H.L. Monaco and G. Artioli, "Experimental methods in X-ray and neutron crystallography," in "Fundamentals of Crystallography (Third edition)," Oxford University Pres. Inc., Nueva York, Estados Unidos, pp. 301-406, 2011.
- [11] H. Gavaghan, "What is a synchrotron?," *Nature*, vol. 410, no. 6829, pp. 722, 2001, DOI: <https://doi.org/10.1038/35070715>.
- [12] W. Minor *et al.*, "Strategies for macromolecular synchrotron crystallography," *Structure*, vol. 8, no. 5, pp. 105-110, 2000, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00139-8](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00139-8)