

CAPÍTULO 7

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Marina Ibáñez Shimabukuro y M. Florencia Rey Burusco

Introducción

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica espectroscópica muy poderosa que nos permite estudiar a nivel atómico moléculas de interés biológico. Complementaria a la técnica de rayos X, constituye una herramienta fundamental para la determinación de estructuras de proteínas y otras biomoléculas en solución. Sin embargo, a diferencia de otras técnicas del campo de la biología estructural, brinda información sobre procesos dinámicos, lo cual representa una de sus características más sobresalientes y en consecuencia, su versatilidad determina que sea ampliamente utilizada. Respecto a los alcances y aplicaciones, podemos mencionar desde la elucidación de compuestos pequeños en la química orgánica, la determinación de estructuras de moléculas biológicas y sus interacciones, y el estudio cinético de reacciones; hasta el diseño racional de drogas y el diagnóstico por imágenes en medicina.

En este capítulo nos enfocaremos en el uso de RMN para el análisis de estructuras de proteínas en solución. Dada la gran complejidad subyacente a esta técnica, nos ajustaremos a brindar nociones básicas que permitan al estudiante comprender cómo se arriba a un conjunto de estructuras tridimensionales, a partir de información experimental. Desarrollaremos las explicaciones de una manera descriptiva, lo más despojada de formalismos posible, con la intención de acercar al lector inexperto al creciente número de publicaciones científicas que emplean RMN, facilitando su abordaje. Para un estudio riguroso, recomendamos la lectura de los trabajos citados en la sección de Bibliografía. Adicionalmente, discutiremos en forma breve algunas

aplicaciones como el análisis de interacción entre biomoléculas y el estudio de proteínas en células (*in cell NMR*).

7.1. Fundamentos

Como se ha desarrollado en capítulos anteriores, la *espectroscopía* es el estudio de la interacción de radiación electromagnética con la materia. En este sentido, los conceptos de *estados de energía* y *distribución de poblaciones* son fundamentales en la espectroscopía de RMN y determinan la posición en frecuencia e intensidad de las señales espectrales (Keeler, 2005). Pero antes que nada, necesitamos conocer cómo se generan estos estados de energía en los *núcleos* y cuáles son las energías y poblaciones asociadas.

Comencemos recordando que los núcleos atómicos están compuestos por protones y neutrones. Cuando en un dado núcleo atómico, los números másico (A) y atómico (Z) son ambos pares, resulta que su número cuántico de espín es igual a cero ($I = 0$). En consecuencia, esto determina que no se genere ninguna señal de RMN y sea invisible desde el punto de vista de esta técnica. Para aquellos núcleos con A par y Z impar, $I > \frac{1}{2}$; por lo que no poseen simetría esférica de carga y presentan dificultades para su observación por RMN. Por último, para aquellos núcleos con A impar, $I = \frac{1}{2}$ y esto determina que se comporten como dipolos magnéticos: es decir que tienen un momento magnético dipolar, μ_B , asociado a su espín nuclear. Cuando estos núcleos se colocan en un campo magnético B_0 , se comportan como pequeños imanes y tienden a alinearse respecto a la dirección del campo aplicado (Hornak, 1997).

De acuerdo a la mecánica cuántica, un núcleo con número cuántico de espín I , puede asumir $2I + 1$ orientaciones en un campo magnético. De aquí se desprende que para aquellos núcleos con $I = \frac{1}{2}$, hay dos orientaciones posibles: paralelos al campo externo B_0 (estado de baja energía, $E = -\mu_B B_0$) o antiparalelos (estado de alta energía, $E = +\mu_B B_0$) (Figura 7.1). El estado de menor energía determina la orientación preferencial de los núcleos. Sin embargo, puede aplicarse energía en forma de radiación electromagnética, que

obligue a esos núcleos a invertir el sentido de su orientación con respecto al campo externo. En esa situación se dice que el sistema está en resonancia.

Esta energía aplicada, ΔE , que es la que separa a los dos estados, es igual a:

$$\Delta E = 2 \mu_B B_0 \quad \text{Ec. 7.1}$$

donde B_0 es el campo magnético que experimentan los núcleos y μ_B es la componente, a lo largo del eje del campo, del momento magnético nuclear. La magnitud del momento magnético nuclear se relaciona con una cantidad, conocida como constante giromagnética γ , que es característica para cada núcleo (Tabla 7.1) mediante:

$$\mu_B = \frac{1}{2} \hbar \gamma \quad \text{Ec. 7.2}$$

con $\hbar = h/2\pi$, siendo h la constante de Planck.

Isótopo	Espin I	Abundancia Natural [%]	γ [$10^7 \cdot \text{rad}/(\text{T} \cdot \text{s})$]
^1H	$1/2$	99,98	26,7519
^2H	1	0,16	4,1066
^{12}C	0	98,9	-
^{13}C	$1/2$	1,108	6,7283
^{14}N	1	99,63	1,9338
^{15}N	$1/2$	0,37	-2,712
^{18}O	0	98,9	-
^{17}O	$5/2$	0,037	-3,6279
^{31}P	$1/2$	100	10,841

Tabla 7.1. Constantes giromagnéticas (γ) y abundancia natural de algunos núcleos con sus valores de espín I correspondientes. En azul se destacan los núcleos comúnmente empleados en el estudio de moléculas biológicas por RMN.

La energía aplicada que provoca la excitación de los espines nucleares, tiene una frecuencia de resonancia asociada, ν , que conserva la conocida relación de Einstein dada por:

$$h \nu = \Delta E \quad \text{Ec. 7.3}$$

de esta manera, obtenemos

$$h \nu = \Delta E = 2 \mu_B B_0 = \hbar \gamma B_0 \quad \text{Ec. 7.4}$$

y entonces, la frecuencia de resonancia,

$$\nu = \gamma B_0 / 2\pi$$

Ec. 7.5

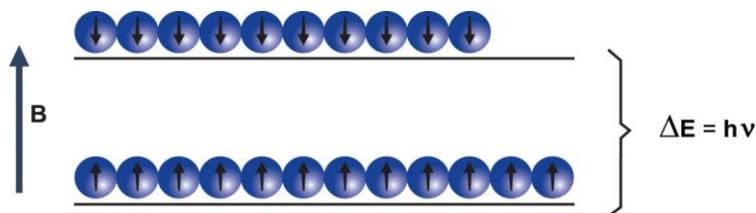


Figura 7.1. Niveles de energía de los dipolos magnéticos nucleares en presencia de un campo B_0 . Nótese el ligero exceso de población en el estado de menor energía, alineado con el campo externo.

Conclusiones:

Hasta aquí podemos resaltar algunos conceptos que serán útiles para comprender las secciones posteriores:

- Los distintos núcleos tienen constantes giromagnéticas, γ , características, que definen la frecuencia de resonancia, y por lo tanto la posición de las señales en los espectros que vamos a adquirir durante los experimentos.
- Ese valor de frecuencia de resonancia también depende, acorde a la ecuación 2.5, del campo sentido por los núcleos. Veremos más adelante la importancia que reviste esta idea, cuando hablemos del llamado corrimiento o desplazamiento químico, que es la herramienta que nos ayudará a identificar a cada uno de los núcleos del sistema de estudio.
- Recordando nociones de fisicoquímica, vemos que existe una relación entre la separación energética de dos estados y la diferencia de población entre ellos. A mayor energía de separación, mayor diferencia entre las poblaciones. A su vez, la diferencia de poblaciones se relaciona con el número de espines que sufren el fenómeno de resonancia y la magnitud observable de este fenómeno. En RMN, esto determina que la sensibilidad vaya de la mano de la fuerza del campo externo y entonces, surge la necesidad de equipamiento poderoso y por añadidura, costoso.

- La relación señal/ruido mejora de forma proporcional a la raíz del número de escaneos, es decir del número de veces que se registren las señales. Como la sensibilidad es un punto clave, un experimento típico de RMN, implica adquirir un mismo espectro un alto número de veces.

7.2. Espectrómetro

Para realizar los experimentos, las muestras se colocan bajo un campo magnético fuerte, en el espectrómetro de RMN. Este equipo consiste en una bobina de un material superconductor a muy bajas temperaturas (menores a 6K), a través de la cual pasa una corriente eléctrica que genera el campo magnético. Una vez que la corriente ha pasado, el campo magnético generado es estable y persistirá indefinidamente sin la necesidad de aplicar más corriente. El espectrómetro está diseñado de modo tal que la zona donde se halla la muestra, entre los polos del imán, se encuentra a temperaturas cercanas a la ambiente (Figura 7.2).

Las frecuencias de resonancia de cada núcleo se determinan usando el campo magnético estático y homogéneo (B_0) que hemos descrito, y además un campo magnético oscilante (B_1). El campo B_1 es aplicado en forma de pulsos de radiofrecuencia mediante una sonda que a su vez detecta las señales recibidas. Los pulsos se generan y controlan mediante una consola (Rule, 2006). Para cada experimento se emplean secuencias de pulsos específicas que el operario comanda desde una computadora, en la cual se van almacenando las señales recibidas previamente amplificadas y digitalizadas en la consola. Posteriormente se procesan y analizan los datos.

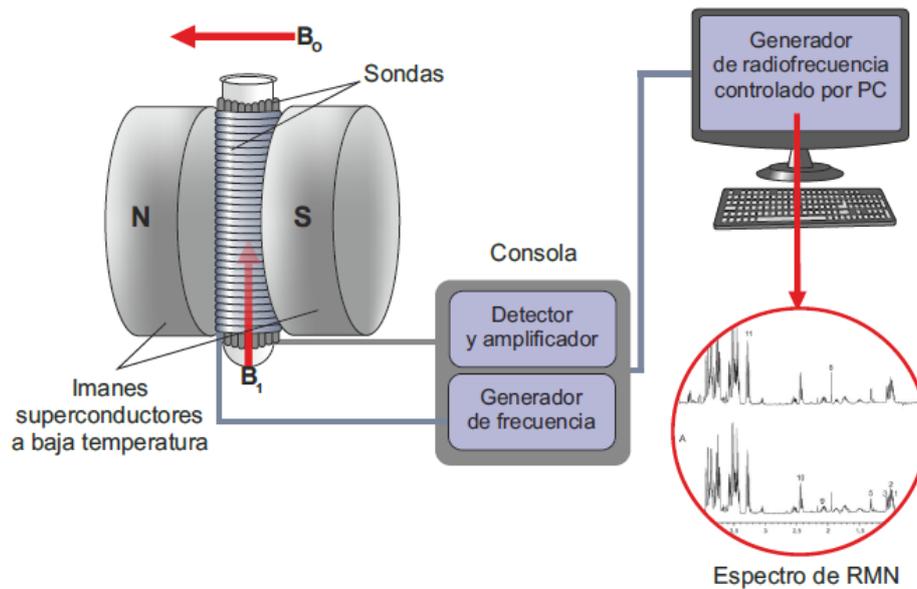


Figura 7.2. Representación esquemática de un espectrómetro de RMN.

7.3. Parámetros Espectrales

Efecto del entorno químico

Como dijimos anteriormente, la frecuencia resonante observada para un núcleo atómico particular depende de dos factores: la naturaleza del núcleo y el campo magnético efectivo que sensa (B_{ef}). Es este segundo factor el que hace de la RMN una técnica tan poderosa, dado que B_{ef} está compuesto no sólo por el campo externo aplicado desde el imán (para simplificar consideramos sólo el B_0 estático), sino también por contribuciones adicionales de otros núcleos y grupos químicos, que actúan como pequeños imanes, modificando el campo magnético local (B_{local}). Las frecuencias de resonancia en RMN son en consecuencia extremadamente sensibles al entorno químico de un núcleo atómico particular, y esto puede ser usado para obtener información estructural precisa (Cooper, 2004). El desplazamiento químico y el acoplamiento espín-espín son modos de describir estas contribuciones adicionales. El primero

consiste en un corrimiento de la señal mientras que el segundo, se manifiesta como un desdoblamiento de la señal. Hay dos tipos de acoplamientos espín-espín: el acoplamiento escalar y el acoplamiento dipolar. El acoplamiento escalar se transmite a través de los enlaces, depende del ángulo diedro y no depende de la orientación espacial. Por otra parte, el acoplamiento dipolar se transmite a través de la distancia decayendo con $1/r^6$ y sí depende de la orientación.

Desplazamiento químico

El desplazamiento químico es el corrimiento en la frecuencia de absorción de un núcleo debido a su entorno químico. Los electrones producen campos magnéticos pequeños que se oponen a B_0 , con una constante de apantallamiento, σ :

$$B_{ef} = B_0 - B_{local} = B_0 (1 - \sigma) \quad \text{Ec. 7.6}$$

En consecuencia, la ecuación para la frecuencia de resonancia toma la forma,

$$\nu = \gamma B_0 (1 - \sigma) / 2\pi \quad \text{Ec. 7.7}$$

Si un núcleo está unido a un elemento de menor electronegatividad, tendrá una alta densidad electrónica que causa un efecto de apantallamiento mayor, corriéndose la señal a regiones de menor frecuencia. Si en cambio el elemento cercano es más electronegativo, los electrones ejercerán un menor apantallamiento y el corrimiento a regiones de menor frecuencia no será tan pronunciado. En el caso de anillos aromáticos el efecto de la corriente de electrones π , puede producir tanto un apantallamiento como un desapantallamiento según la posición del núcleo con respecto al anillo y al campo magnético.

El desplazamiento químico obtenido en unidades de frecuencia no puede compararse directamente con resultados provenientes de equipos diferentes porque, tal como se desprende de la fórmula, depende del campo magnético aplicado.

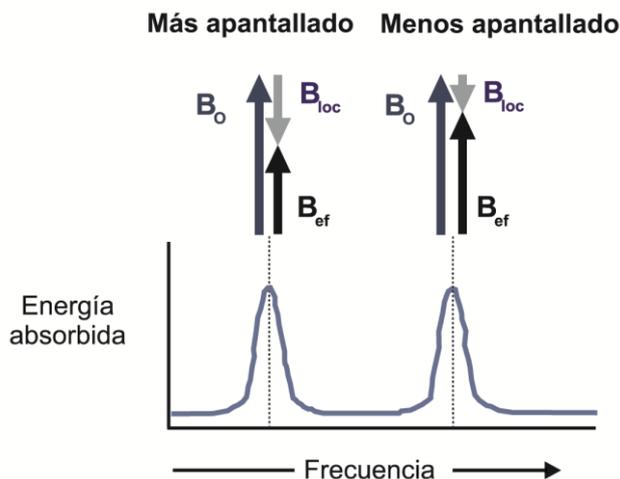


Figura 7.3. Desplazamiento químico. Los núcleos sufren un corrimiento en la frecuencia de absorción que depende del entorno en que se encuentran. Se producirá un corrimiento hacia menores frecuencias si el campo efectivo (B_{ef}) que sensa es menor a B_0 debido a un campo local que se opone, B_{loc} . Este es el caso del apantallamiento generado por una alta densidad de electrones si el núcleo está unido a un elemento menos electronegativo. Si el B_{loc} es menor, porque el elemento vecino es más electronegativo, el núcleo en cuestión no está tan apantallado y, en consecuencia, el corrimiento no es tan pronunciado.

Para independizarse del campo, se define al desplazamiento químico δ en una escala relativa, tomando un núcleo de referencia (como por ejemplo los H equivalentes del compuesto tetrametilsilano), y se calcula la diferencia de resonancias con el núcleo de estudio. Asimismo, como la magnitud δ es pequeña en comparación con B_0 , resulta más práctico expresarla en partes por millón (ppm):

$$\delta = \frac{\nu_x - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} 10^6 \quad \text{Ec. 7.8}$$

De este modo el desplazamiento químico δ queda expresado en ppm y es independiente del espectrómetro utilizado.

Un aspecto interesante de los datos de desplazamiento químico, es que partir de ellos se pueden estimar los ángulos de torsión y, en consecuencia, predecir la estructura secundaria.

Acoplamiento escalar

El acoplamiento escalar se manifiesta por la influencia que ejerce un núcleo activo de RMN sobre otro núcleo activo, que se transmite a través de los electrones de enlace.

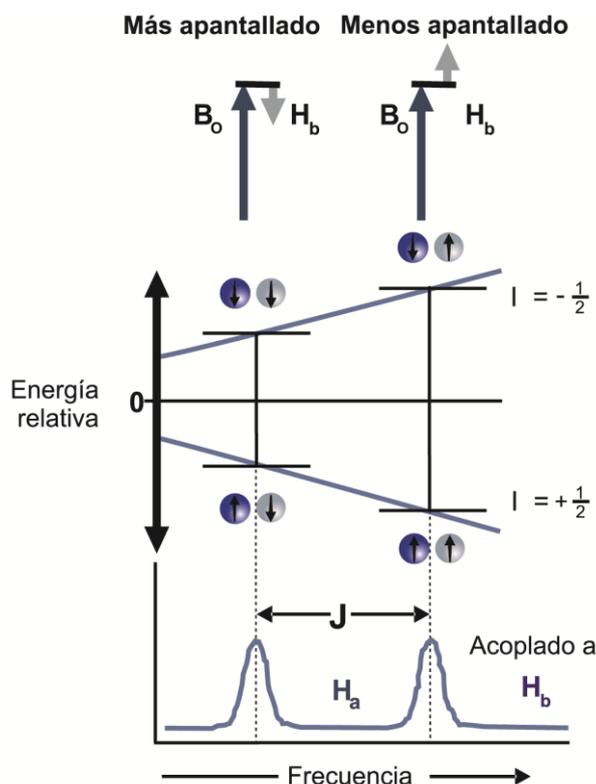


Figura 7.4. Acoplamiento escalar. Para dos núcleos acoplados H_a y H_b , se observa un desdoblamiento en la señal de H_a . La separación en Hertz entre los picos de la señal desdoblada, es el acoplamiento escalar J . El desdoblamiento de la señal se produce porque el campo magnético que percibe H_a disminuye o se incrementa si el espín de H_b se encuentra en contra o a favor del campo.

El origen del acoplamiento escalar se encuentra en la polarización provocada por el espín nuclear en los electrones de enlace. Si se tienen dos núcleos acoplados, uno de ellos siente a través de los enlaces químicos un incremento o disminución en el campo magnético debido al espín a favor o en contra del núcleo vecino. Este fenómeno produce un desdoblamiento de la señal cuya separación medida en Hz se conoce como constante de acoplamiento J .

Esta constante depende de la naturaleza del núcleo y su constante giromagnética γ , de la electronegatividad de los núcleos involucrados, del número de enlaces, y de los ángulos en que están enlazados, pero no depende

del campo magnético aplicado. El acoplamiento escalar será exactamente el mismo en cualquier equipo de RMN independientemente de B_0 .

En base a la cantidad de enlaces que separan a dos núcleos se definen tres tipos de acoplamientos J:

1J acoplamiento escalar de primer orden: Constante de acoplamiento para dos núcleos unidos mediante un enlace.

2J acoplamiento escalar de segundo orden: En este caso, los núcleos se hallan separados por dos enlaces.

3J acoplamiento escalar de tercer orden: Es el acoplamiento más útil para estudios estructurales porque los núcleos relacionados con los ángulos de torsión en las proteínas se encuentran a tres enlaces de distancia.

En la Figura 7.5 se muestran valores de algunas constantes de acoplamiento típicas en proteínas.

En el caso de las proteínas se puede representar 3J mediante la ecuación de Karplus:

$$^3J(\theta) = A \cos^2 \theta + B \cos \theta + C \quad \text{Ec. 7.9}$$

Donde θ es el ángulo diedro entre dos núcleos de hidrógeno y los valores A, B y C son parámetros experimentales.

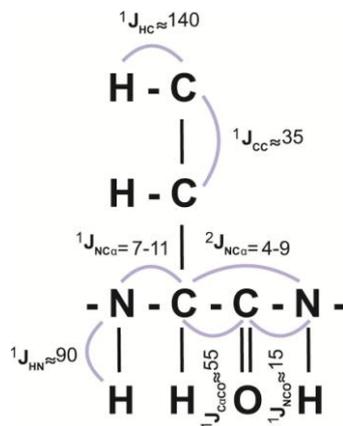


Figura 7.5. Ejemplos de constantes de acoplamiento escalar típicas de proteínas.

Con esta ecuación, se relaciona entonces la constante de acoplamiento con los ángulos diedros, pudiendo por ejemplo obtenerse información estructural de la cadena principal de una proteína.

Los diferentes elementos de estructura secundaria de una proteína tienen valores de ángulos diedros característicos y en consecuencia también valores de 3J .

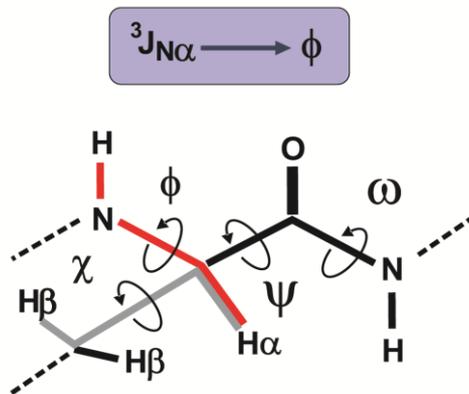


Figura 7.6. Ángulos de torsión en un segmento de cadena polipeptídica. En particular, el ángulo diedro psi, ϕ , guarda relación con la constante de acoplamiento $^3J_{NH-H\alpha}$ mediante la ecuación de Karplus. La orientación relativa del enlace H-N respecto al enlace C α -CO, se puede relacionar con la estructura secundaria.

Acoplamiento dipolar

El acoplamiento dipolar se manifiesta a través del espacio; dependiendo de la proximidad espacial y de la orientación respecto a B_0 .

En solución, las moléculas se mueven aleatoriamente con respecto a B_0 ; esto resulta en que los diferentes acoplamientos que se den en las moléculas se promedien a cero y de allí que el acoplamiento dipolar no se manifieste como un fenómeno directamente observable.

Sin embargo, debemos reparar en dos importantes cuestiones que surgen como consecuencia del acoplamiento dipolar. Una de ellas es el efecto nuclear Overhauser (NOE, de acuerdo a sus siglas en inglés). De forma muy simplificada, este efecto radica en que un núcleo es capaz de modificar los parámetros asociados a la relajación de otro núcleo cercano, y en consecuencia las señales que este último emite se ven intensificadas o atenuadas. La *magnitud* de este efecto guarda relación con la *distancia* que separa dichos núcleos. Debido a que el efecto se transmite a través de la

distancia, decayendo con $1/r^6$ y perdiendo efecto a distancias mayores a 5 Å, se puede correlacionar la intensidad de las señales con distancias internucleares. Estas distancias internucleares son las que nos darán información esencial para determinar el plegamiento tridimensional de las proteínas (Wüthrich, 2003).

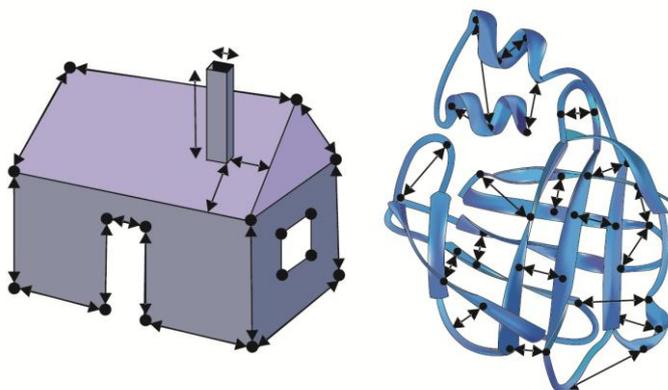


Figura 7.7. Como lo expresó el premio Nobel de química 2002, Kurt Wüthrich: “si uno conoce todas las medidas de una casa, puede construir un esquema 3D de esa casa. De la misma manera, midiendo un gran número de pequeñas distancias en una proteína, es posible crear una imagen de la estructura tridimensional de la misma”.

Por otro lado, si uno pudiera de alguna manera eliminar la condición de movimiento aleatorio de la proteína respecto a B_0 , vería una resultante, producto del acoplamiento dipolar, que de otra manera promedia a cero (Lipsitz, 2004). Esto puede lograrse introduciendo en el medio alguna sustancia que provoque cierto grado de alineamiento en las moléculas proteicas, restringiendo parcialmente su movimiento. Experimentalmente se recurre a micelas, fagos o geles, entre otros, para crear ese medio anisotrópico. Seguidamente, se corren experimentos específicos que permiten calcular los llamados acoplamientos dipolares residuales (RDC, de acuerdo a sus siglas en inglés). Los RDCs reportan información que tiene que ver con la orientación relativa entre dos núcleos, respecto al campo externo B_0 , de manera que pueden brindarnos información de gran interés en cuanto a la disposición de distintos dominios dentro de una proteína, o entre porciones alejadas en el plegamiento (Gronenborn, 2002).

Relajación

La relajación es un proceso mediante el cual los espines de los núcleos perturbados por pulsos de radiofrecuencia vuelven al equilibrio (Keeler, 2005). Desde el punto de vista fenomenológico, pueden indentificarse dos tipos de relajación diferentes: la relajación espín-entorno, caracterizada por una constante T_1 , y relajación espín-espín, asociada a la constante T_2 . Desde el punto de vista práctico, conocer el tiempo que tarda una muestra en volver al equilibrio es importante, debido a que esto determina el tiempo que es necesario esperar para realizar el siguiente escaneo.

Un núcleo aislado no se puede reorientar por sí mismo dado que este proceso requiere una transferencia de energía hacia el entorno, y el tiempo que tarda en relajarse depende de interacciones entre el núcleo perturbado y sus alrededores. La vuelta al estado de equilibrio térmico describe un decaimiento exponencial, con una constante de tiempo T_1 denominada tiempo de relajación longitudinal. El tiempo de relajación T_1 , está relacionado con la fluctuación del campo magnético local percibida por el núcleo como consecuencia de núcleos vecinos, presentes tanto en la misma molécula como en el solvente circundante. Los valores de T_1 dependen de cuán rápido se mueve aleatoriamente en solución la molécula que contiene al núcleo.

Los efectos anisotrópicos espín-entorno son más significativos con muestras sólidas o membranas biológicas, donde el movimiento y los giros son mucho más lentos y restringidos. Para tales casos, se han desarrollado técnicas de RMN en estado sólido.

El tiempo de relajación T_2 está relacionado con el intercambio de espín entre núcleos. Por procesos no conservativos, que dependen de la entropía del sistema se produce una pérdida de coherencia de fase de algún núcleo con respecto a los que presentan la misma frecuencia. Este efecto mecánico-cuántico que no lleva a una transferencia de energía hacia los alrededores, sino a una transferencia de magnetización hacia un núcleo cercano, también ocurre mediante un decaimiento exponencial y su constante de tiempo T_2 se denomina tiempo de relajación transversal. T_2 está relacionada con el ancho de

banda espectral, de modo que el ancho ($\Delta\nu$) es proporcional a $1/T_2$. La relajación espín-espín tiende a ser más eficiente (T_2 es menor) para moléculas con movimientos aleatorios lentos, que es el caso de proteínas y otras macromoléculas de gran tamaño, y lleva a un ensanchamiento y solapamiento significativo de las señales.

En particular, para los núcleos de ^{15}N , las medidas de los tiempos de relajación, en conjunto con otro parámetro denominado NOE heteronuclear, resultan en valiosos aportes al estudio por RMN dado que brindan información acerca de los procesos dinámicos en las moléculas, como la difusión rotacional, las velocidades de fluctuaciones conformacionales y otros movimientos internos.

Conclusiones

En resumen, hasta aquí hemos visto qué tipo de datos se pueden obtener a partir de experimentos de RMN y qué información puede inferirse a partir de ellos. A modo de síntesis podemos agrupar los parámetros espectrales según su origen:

- Información del entorno particular de cada núcleo

Parámetros	Utilidad / Información asociada
Desplazamiento Químico	Identificación individual de espín Ángulos de torsión de la cadena principal

- Información de la interacción entre los núcleos:

Parámetros	Utilidad / Información asociada
Acoplamiento Escalar	Identificación de sistemas de espín Ángulos de torsión
Acoplamiento Dipolar	
NOEs	Distancias entre núcleos cercanos en el espacio
RDCs	Orientaciones relativas

- Información de los residuos individuales y de la proteína en general

Parámetros	Utilidad / Información asociada
Tiempos de relajación T_1 , T_2 y NOEhet, τ_c	Dinámica del sistema

7.4. Cómo se obtiene un espectro

El experimento más sencillo de RMN es el denominado de onda continua. Existen dos alternativas para desarrollar este experimento: a) Barrer la frecuencia del campo de excitación fijando el valor del campo externo, o bien b) manteniendo constante la frecuencia del campo de excitación, aumentar progresivamente la intensidad del campo magnético B_0 . Para ambos casos el fenómeno de resonancia se manifiesta cuando la diferencia de energía de los dos estados de espín, determinada por el campo B_0 , coincide con la energía suministrada por el pulso de radiofrecuencia del campo de excitación. Si bien este enfoque es simple e intuitivo acarrea la desventaja de que podemos determinar un sólo valor de frecuencia por experimento. Además el barrido exhaustivo de cada espectro insume tiempo, que se va acrecentando enormemente si necesitamos repetir el experimento para obtener una mejor relación señal/ruido.

Con el fin de superar estos inconvenientes y gracias al continuo avance tecnológico en el campo de RMN, desde los años 70, los espectros se obtienen mediante un enfoque distinto (Sánchez, 2007). Este nuevo enfoque se conoce como RMN con transformada de Fourier (FT-NMR, de sus siglas en inglés). Aquí, en lugar de barrer campos o frecuencias, se mantiene el campo externo constante y se perturba al sistema con un pulso de radiofrecuencia corto que afecta a un rango de núcleos. Seguidamente se registra cómo responde el sistema frente a esta perturbación. La forma en que esos espines nucleares vuelven al equilibrio se conoce como FID (*free induction decay*) y el ritmo con que esa señal decae guarda relación con la frecuencia de resonancia de cada núcleo. El hecho de que perturbemos un rango de núcleos a la vez y luego

registremos la respuesta de todos ellos en una misma FID trae aparejada la necesidad de decomponer posteriormente esa señal, muy compleja, en sus componentes individuales. Esta labor se resuelve mediante la operación de transformada de Fourier. Resumidamente, esta aplicación matemática devuelve información en el dominio de la frecuencia a partir de los espectros originales que se hallan en el dominio del tiempo. Este formato permite la adquisición múltiple de señales, lo que resulta en una ganancia de tiempo y por ende, de sensibilidad ya que además de una mejora intrínseca en la sensibilidad, el tiempo recuperado puede invertirse para acumular más espectros e incrementar la relación señal/ruido.

7.5. Ejemplo práctico: Determinación de estructura

Para la determinación estructural por RMN de una proteína se pueden seguir diferentes estrategias, con distintos conjuntos de experimentos, que dependerán de cada sistema de estudio en particular. A modo de ejemplo, para una proteína de tamaño intermedio podemos proponer el siguiente esquema:

Obtención de proteína marcada

Para estudios de RMN, es requisito que la proteína se encuentre altamente concentrada y en gran estado de pureza. Por otra parte, para la adquisición de espectros de dos y tres dimensiones es necesario introducir marca isotópica de ^{13}C y ^{15}N . Para ello, resulta práctico recurrir a la tecnología de ADN recombinante y sobreexpresar la proteína a partir de cultivos crecidos en medios mínimos. Dependiendo de los experimentos que se vayan a adquirir, los medios se complementan con reactivos como $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ y ^{13}C -glucosa como únicas fuentes de nitrógeno y carbono. Es esencial remover cualquier contaminante de la muestra, por lo que la purificación debe ser exhaustiva, y

generalmente se incluyen distintas técnicas cromatográficas en el protocolo de obtención (Figura 7.8).

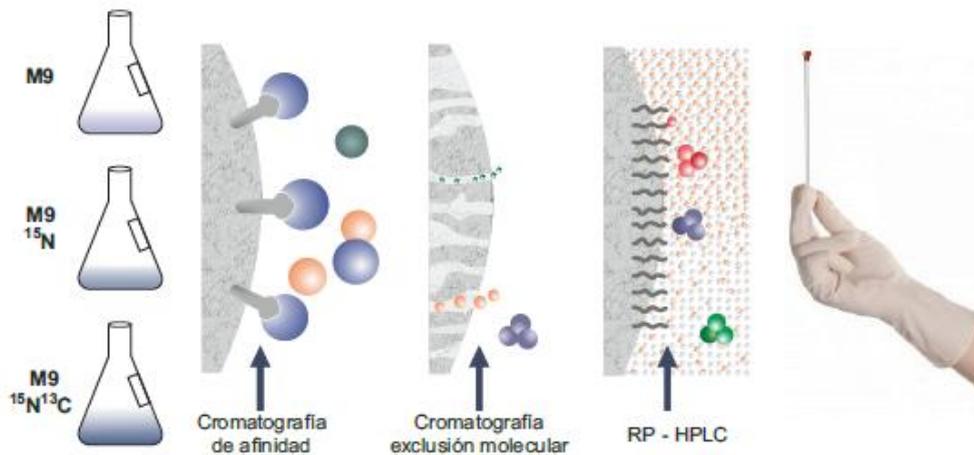


Figura 7.8. Para la obtención de una proteína que va a ser estudiada por RMN, los medios de cultivo se enriquecen isotópicamente, dependiendo de los espectros que vayan a adquirirse. El protocolo de purificación puede incluir distintos pasos cromatográficos tendientes a que la proteína se encuentre en un elevado grado de pureza, altamente concentrada, sin que ocurra agregación ni precipitación. Idealmente la muestra debe ser estable en el tiempo y la proteína no exceder los 30 kDa a fin de no afectar la calidad de las señales, ni dificultar la asignación.

Experimentos y asignación de resonancias

En primer lugar se adquieren espectros de una dimensión 1D-¹H. Estos espectros, en los que se utiliza proteína no marcada, brindan información cualitativa y sirven para comprobar el correcto plegamiento y estado monomérico en solución (Figura 7.9).

A continuación, se toman espectros de dos dimensiones. Un experimento de gran utilidad es el llamado ¹⁵N-HSQC (del inglés *Heteronuclear Single Quantum Coherence*), que relaciona núcleos de nitrógeno e hidrógeno unidos, como los que se encuentran en los enlaces peptídicos de la proteína (excepto en las prolinas). De esta manera, por cada grupo amida se verá un pico en el espectro ¹⁵N-HSQC (Figura 7.9).

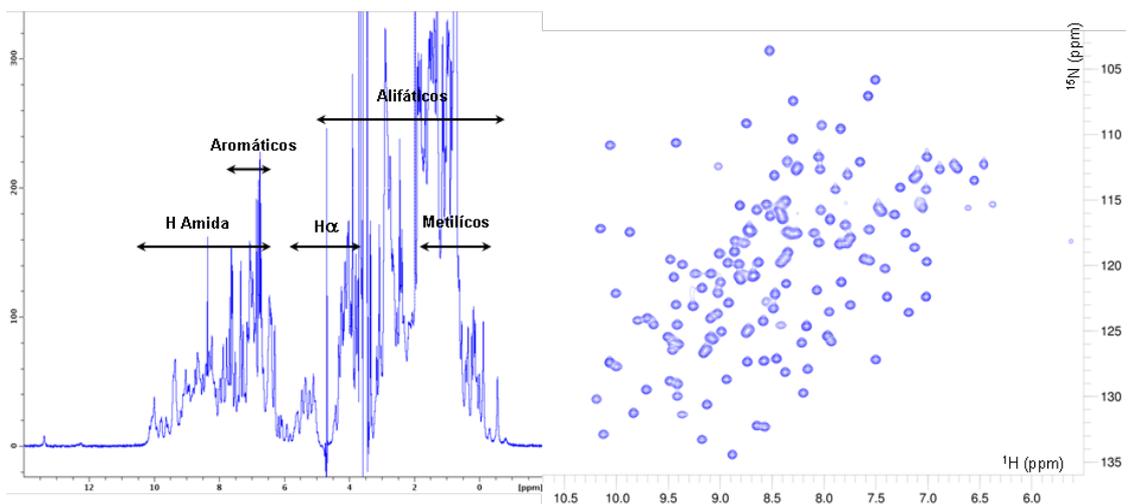


Figura 7.9. A la izquierda: espectro $1D^1H$ de una muestra de proteína, plegada y en estado monomérico. Se señala la distribución de desplazamientos químicos de distintos grupos de protones. A la derecha: espectro ^{15}N -HSQC de una proteína de ~ 20 kDa. Cada pico corresponde a un grupo NH de la cadena polipeptídica.

El paso siguiente consiste en adquirir juegos de experimentos de tres dimensiones que correlacionan al N amida de cada residuo con sus respectivos $C\alpha$ y $C\beta$ y con los del residuo precedente en la secuencia (Figura 7.10). Conociendo de antemano la secuencia proteica, y sobre la base de algunas frecuencias particularmente distintivas, es posible concatenar y asignar la identidad de cada pico en los espectros. En forma simplificada, encontrar la secuencia relacionando espectros (“asignación secuencial”) se asemeja a ordenar las fichas de un dominó. De esta manera quedan asignadas las resonancias de la cadena principal.

Para extender la asignación a las cadenas laterales se corren experimentos como el HCCH-TOCSY que relaciona a los carbonos e hidrógenos pertenecientes a cada residuo aminoacídico.

Generación de restricciones y cálculo

La resolución de la forma tridimensional de una proteína por RMN consiste en generar un conjunto de estructuras que mejor satisfagan las restricciones experimentales en el marco de un modelo que reúne información empírica

sobre la geometría de la estructura covalente de los aminoácidos, y que además alcanza un valor de mínima energía.

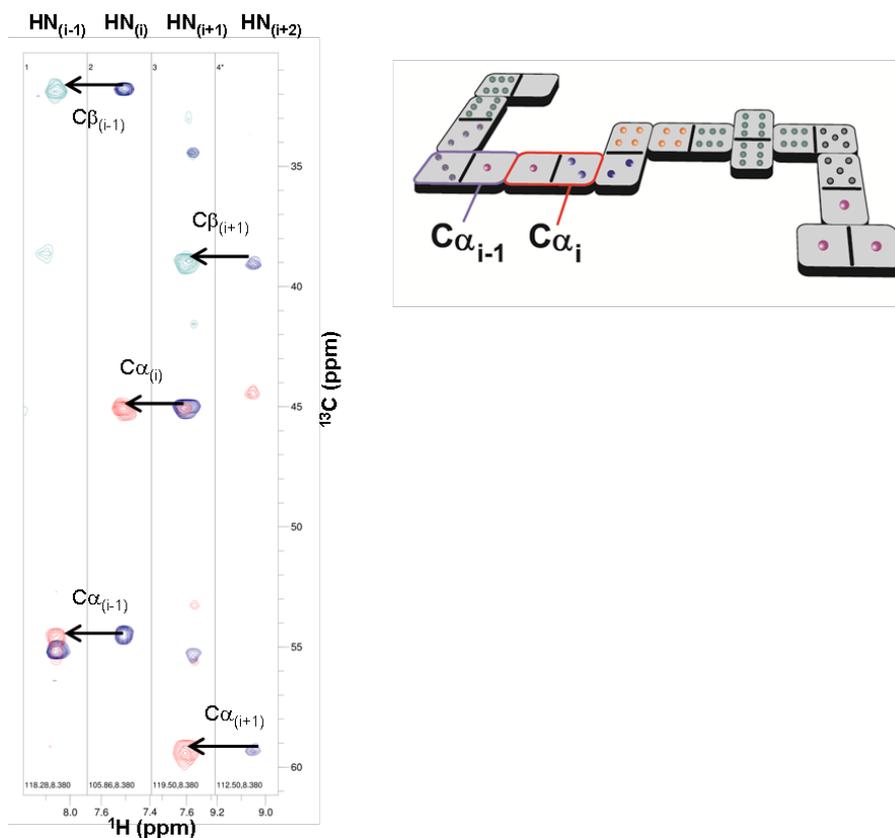


Figura 7.10. Asignación de desplazamientos químicos de $^{13}\text{C}\alpha/\beta$ empleando espectros 3D HNCACB (verde y rojo) y CBCA(CO)NH (azul), con ^1H en el eje x, ^{13}C en y, y ^{15}N en z. Se establece la conectividad haciendo coincidir los desplazamientos químicos de los $^{13}\text{C}\alpha/\beta$ en el HNCACB (relacionados al desplazamiento químico del HN del residuo i), con los desplazamientos químicos de los $^{13}\text{C}\alpha/\beta$ en el CBCA(CO)NH (relacionados al desplazamiento químico del HN del residuo $i-1$). El proceso se asemeja a acomodar piezas de dominó.

Dentro de la información empírica se incluyen longitudes y ángulos de enlace, y potenciales definidos a fin de que las uniones se mantengan dentro de los límites reales. Para distancias no definidas, los programas de cálculo emplean potenciales que controlan las interacciones electrostáticas y de Van der Waals, asegurando que los átomos no se aproximen entre sí más de lo que el potencial de Lennard-Jones permite. Respecto a la información experimental de RMN, una vez asignada la mayor cantidad posible de señales, y utilizando los parámetros descritos en la sección 2 (constantes de acoplamiento, desplazamiento químico, NOEs, RDCs), se pueden generar distintos conjuntos de restricciones. Estas restricciones experimentales brindan información sobre

la posición relativa de cada núcleo en la proteína. Algunas de ellas, como las que derivan de las constantes de acoplamiento, dan idea de los ángulos de torsión en la proteína y en consecuencia, de su estructura secundaria. Otras, como las que derivan del efecto Overhauser, llamadas NOEs, imparten distancias entre núcleos cercanos (Figura 7.11). Y otras como los RDCs dan información de la orientación relativa a mayores distancias.

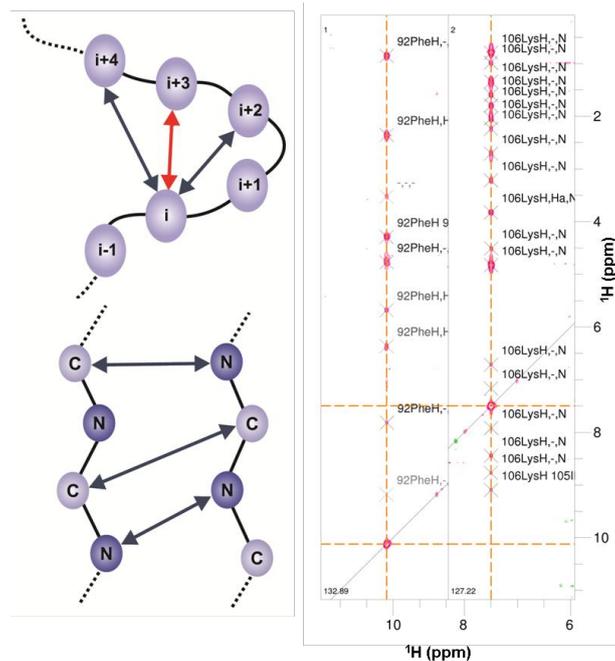


Figura 7.11. A la izquierda: esquema de plegamientos α -hélice y hoja- β , presentes en una proteína. Las distancias regulares en dichos plegamientos dan origen a patrones de NOEs característicos. A la derecha: tiras de un espectro ^{15}N NOESY-HSQC donde se distinguen varios picos de cruce debidos a núcleos de H cercanos para dos grupos NH.

Los programas de cálculo como XPLOR, ARIA-CNS o CYANA integran, mediante distintos algoritmos, la información empírica sobre la topología y geometría de las proteínas en general, con las restricciones experimentales generadas a partir del análisis de los espectros de RMN (Figura 7.12). El proceso mediante el cual se generan los modelos estructurales, involucra sistemas de dinámica molecular que apuntan a la minimización de su energía (Rieping, 2007). A fin de evitar mínimos locales, frecuentemente se recurre al denominado *annealing* simulado (*simulated annealing*), donde se eleva la temperatura de las moléculas, y de esta forma, la energía cinética entregada permite superar las barreras energéticas. Luego, se enfría el sistema

lentamente, permitiendo que evolucione a estructuras energéticamente favorables, al mismo tiempo que se van ponderando las constantes de energía de las restricciones experimentales.

El proceso de cálculo es iterativo y concluye con un conjunto de modelos que mejor satisfacen las restricciones experimentales, que no reducen más allá su energía y que convergen entre sí.

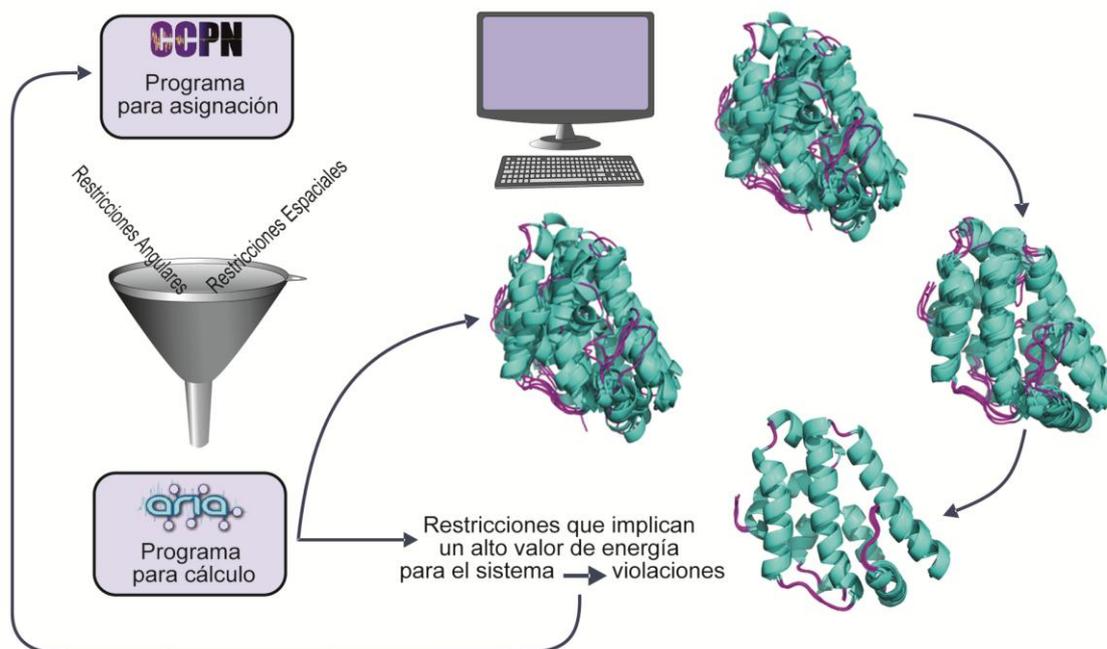


Figura 7.12. A la izquierda: esquema global del proceso de determinación de estructura por RMN. A la derecha: conjunto de estructuras calculadas en distintas etapas del refinamiento.

Refinamiento

Existen programas de cálculo como ARIA que además del conjunto de estructuras-resultado, devuelve una lista de aquellas restricciones experimentales rechazadas que no se acomodaron en el modelo calculado. A partir del análisis de estas restricciones, que representan violaciones, comienza un proceso iterativo de refinamiento (Vranken, 2005). Durante el refinamiento se pueden incorporar más experimentos que ayuden a asignar resonancias cuya identidad hasta el momento, sea ambigua o desconocida; o bien experimentos adicionales a partir de los cuales se generen nuevas

restricciones. Se evalúan además otros posibles orígenes para estas restricciones violadas como la selección de señales espurias como verdaderas, etc. Paulatinamente se va “puliendo” la información experimental y luego de sucesivas instancias de cálculo, las estructuras resueltas van convergiendo y minimizando su energía (Figura 7.12). Finalmente se valida el conjunto de estructuras. Para ello se cuenta con diversos programas que corroboran la consistencia del modelo en términos estadísticos. Parte del proceso de validación comprende la comparación de parámetros esperados a partir del modelo calculado con los derivados de las mediciones experimentales. Se evalúa además, si los ángulos obtenidos caen en regiones favorables de los gráficos de Ramachandran.

7.6. Aplicaciones

Análisis de interacción por RMN

La resonancia magnética nuclear permite caracterizar las interacciones proteína-ligando en términos de afinidad y especificidad, identificar los sitios de unión y evidenciar los cambios estructurales producidos (Goldflam, 2012).

La interacción de un ligando con una proteína tiene como resultado la formación de un complejo que está en equilibrio con las formas libres de la proteína (P) y el ligando (L).



Con la formación del complejo se produce la estabilización de conformaciones diferentes a las que se encuentran para las estructuras más abundantes de ambas especies libres en solución.

Las diferencias conformacionales presentes tienen como resultado un cambio en los parámetros de RMN. Por ejemplo, pueden registrarse cambios en:

- Desplazamientos químicos
- Parámetros de relajación T_1 , T_2 y NOEs
- Otros parámetros dinámicos como τ_c

- Coeficientes de difusión

En consecuencia, la interacción proteína-ligando puede estudiarse mediante diferentes experimentos que evalúen estos parámetros.

Analizando los desplazamientos químicos se puede establecer si la interacción corresponde a un intercambio lento o rápido en la escala de tiempo de RMN y evaluar de este modo la constante de afinidad para la formación del complejo. Para ello, se puede realizar por ejemplo, una titulación agregando cantidades crecientes de L a P marcada con ^{15}N en solución, monitoreando los cambios producidos en las señales en los espectros ^{15}N -HSQC. En la Figura 7.13 se muestra una representación esquemática.

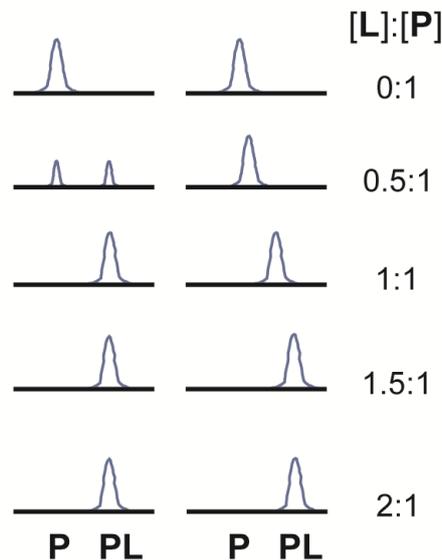


Figura 7.13. Representación esquemática de los desplazamientos químicos registrados para la formación de un complejo PL. A la izquierda se muestra una situación de intercambio rápido; a la derecha, de intercambio lento. Se parte de P libre en solución (en negro) y se van agregando cantidades crecientes de L. En este ejemplo sólo la proteína presenta marca, por lo que no se observan desplazamientos químicos para L.

Si la proteína presenta una alta afinidad por el ligando, la vida media del complejo es larga en la escala de tiempo de RMN, por lo que se observará para aquellos núcleos afectados en el proceso de unión, un pico correspondiente a la conformación P libre y otro para P formando el complejo PL. Esta es la situación de intercambio lento característica de una constante de disociación submicromolar ($K_d < \mu\text{M}$).

En una situación de intercambio rápido, donde la afinidad por el ligando es baja, el complejo se forma y disocia con mayor rapidez. Es por ello que por cada grupo amida de la proteína se observa un único pico que presenta un desplazamiento químico que es una especie de promedio pesado entre los correspondientes a P libre y a P unida a L. En este caso, la constante de disociación del complejo es mayor al orden micromolar ($K_d > \mu\text{M}$).

Es importante destacar que una ventaja del estudio de interacción por RMN es que no está limitado a sistemas de alta afinidad, sino que pueden estudiarse interacciones muy débiles que otras técnicas no detectan. Sin embargo, también es necesario advertir que existen situaciones de intercambio intermedio donde las señales se ensanchan y se pierden dificultando el análisis de esos complejos mediante RMN.

RMN en células (*in cell NMR*)

La espectroscopía de RMN en células permite investigar tanto la *conformación* como la *dinámica* de proteínas en células vivas (Serber, 2005). Dado que la función de una proteína dentro de las células se encuentra estrechamente vinculada a su localización y estado conformacional, la espectroscopía de RMN en células resulta una herramienta sumamente poderosa por su naturaleza no invasiva. Su poder reside en observar cambios en las estructuras de macromoléculas biológicas y sus interacciones con otros componentes celulares (Burz, 2009). El estudio de macromoléculas por medio de esta técnica se basa en la expresión de estas moléculas, marcadas con isótopos activos para RMN (generalmente ^{15}N), para medir espectros directamente a partir de una suspensión de las células productoras de la molécula de estudio. El gran número de líneas de resonancia pertenecientes a estas macromoléculas casi siempre requiere la medida de espectros de RMN de al menos dos dimensiones. Como vimos anteriormente, la posición exacta de la frecuencia de resonancia de un núcleo atómico en una macromolécula depende de forma sensible al entorno magnético que lo circunda. Los cambios que se produzcan

en dicho entorno, causados por modificaciones postraduccionales, cambios conformacionales, o eventos de unión, resultarán en cambios el corrimiento químico (Burz, 2010).

En principio, la espectroscopía de RMN en células resultaría además muy atractiva por ofrecer la gran ventaja de evitar la purificación de la muestra al registrar los espectros de RMN necesarios, directamente dentro de las células que sobreexpresan la macromolécula de interés. Sin embargo, es poco probable que se recurra a la espectroscopía de RMN en células para determinar exhaustivamente estructuras tridimensionales de macromoléculas *in vivo*, ya que los métodos tradicionales *in vitro* ofrecen ventajas fundamentales en cuanto a la nitidez de las señales y a la estabilidad de la muestra en el transcurso de un experimento multidimensional de varios días. Estas últimas cuestiones resultan prioritarias respecto al potencial ahorro de tiempo que significaría saltar los protocolos de purificación.

Los principales desafíos de la espectroscopía de RMN en células aparecen en la preparación de la muestra. Esto se debe a la necesidad de que la misma presente una gran homogeneidad, además de resultar indispensable mantener a las células vivas durante las medidas. Más allá de las dificultades planteadas, el trabajo realizado en pos de superar los desafíos técnicos es muy importante y son numerosos los trabajos publicados en este sentido. La motivación subyacente lo justifica ampliamente: el desarrollo de las tecnologías de RMN en células permiten obtener información a nivel atómico de las proteínas en su ambiente nativo.

Bibliografía

Burz DS, Shekhtman A. Structural biology: Inside the living cell, Nature 458(7234) 37-8, 2009.

Burz DS, Shekhtman A. The STINT-NMR method for studying in-cell protein-protein interactions, Curr Protoc Protein Sci. Chapter 17: Unit 17.11, 2010.

Cooper A. Biophysical Chemistry. 184 páginas. RSC Tutorial Chemistry Text #16, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2004.

Hornak JP. The Basics of NMR, a hypertext book on nuclear magnetic resonance spectroscopy. Copyright © 1997-2010. www.cis.rit.edu/htbooks/nmr.

Goldflam M, Tarragó T, Gairí M, Giralt E. NMR Studies of Protein–Ligand Interactions, Protein NMR Techniques, Methods in Molecular Biology 831 233-259, 2012.

Gronenborn AM. The importance of being ordered: improving NMR structures using residual dipolar couplings, C R Biol 325(9) 957-66, 2002.

Keeler J. Understanding NMR Spectroscopy, Department of Chemistry, University of Cambridge, UK, 2005.

Lipsitz RS, Tjandra N. Residual dipolar couplings in NMR structure analysis, Annu Rev Biophys Biomol Struct 33 387-413, 2004.

Rieping W, Habeck M, Bardiaux B, Bernard A, Malliavin TE, Nilges M. ARIA2: automated NOE assignment and data integration in NMR structure calculation, Bioinformatics 23 381-382, 2007.

Rule GS, Hitchens TK. Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy. Series: Focus on Structural Biology, 5 XXVI 531, Springer, Berlin, ISBN 1-4020-3499-7, 2006.

Sánchez Ferrando F. Breve resumen histórico de la resonancia magnética nuclear, www.uam.es/otros/germn/images/01Historia_RMN.pdf, 2007.

Serber Z, Corsini L, Durst F, Dötsch V. In-cell NMR spectroscopy, Methods Enzymol 394 17-41, 2005.

Vranken WF, Boucher W, Stevens TJ, Fogh RH, Pajon A, Llinas M, Ulrich EL, Markley JL, Ionides J, Laue ED. The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline, Proteins 59(4) 687-96, 2005.

Wüthrich K. NMR studies of structure and function of biological macromolecules (Nobel Lecture), J Biomol NMR 1 13-39, 2003.

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/illpres/nmr.html