

Análisis de la estructura tridimensional de biomacromoléculas mediante la resonancia magnética nuclear (R.M.N.)

AIDA DÍAZ RUANO

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
Apartado Postal 6162, La Habana, Cuba

Es un hecho establecido que para lograr el esclarecimiento de las funciones que las biomacromoléculas realizan en los organismos vivos, es necesario conocer su estructura tridimensional.

Puede decirse que poco se ha avanzado en este aspecto, a pesar del interés práctico que este hecho presenta en virtud de la complejidad del problema. Actualmente son conocidas las estructuras tridimensionales o resolución atómica, de solamente 250 proteínas. Estas estructuras han sido obtenidas, en su inmensa mayoría, mediante la cristalografía de rayos X que presenta limitaciones fundamentalmente por el tiempo que se invierte en realizar estos análisis, que requieren un lapso promedio de 5 años (Van Brient, J., 1986). Otro problema de la cristalografía de rayos X es la imposibilidad de cristalizar algunas proteínas (Mayo, K.H., 1984). En estos problemas existe un interés mundial en buscar técnicas y métodos alternativos.

Hace aproximadamente 20 años, se trató de estudiar por primera vez las proteínas utilizando la resonancia magnética nuclear (RMN), pero desde ese momento se hizo clara la necesidad de realizar un gran trabajo para obtener alguna información de valor. Solamente el desarrollo tecnológico ha permitido la obtención de tal objetivo. En la tabla 1 se sintetizan cronológicamente los hechos que han permitido la utilización ventajosa de la RMN en biología.

La principal ventaja que presenta la RMN sobre la cristalografía de rayos X, es la posibilidad de realizar dichos estudios en solución, lo que es de importancia para aquellos compuestos que no se han podido obtener en forma cristalina o en los casos en que existan configuraciones diferentes en las muestras cristalinas, como ha ocurrido con la configuración Z del ADN (Kens, D.R., 1982).

El problema fundamental que ha presentado la RMN para el estudio de la estructura de las macromoléculas, ha sido la dificultad de realizar las asignaciones protónicas a causa del gran número de líneas de resonancia presentes y extendidas en un rango de frecuencia de solo unos cuantos kilohertz, por lo que la superposición de las líneas se observa en muchos casos.

En fecha relativamente reciente, un grupo de Zürich, encabezado por K. Würthrich, ha utilizado ventajosamente los métodos de la RMN, para no solamente realizar las asignaciones protónicas correctamente, sino que lograron construir un esquema para la determinación de la estructura tridimensional de las proteínas (Würthrich *et al.*, 1982). Este grupo ha utilizado los métodos de dos dimensiones (2 D), en los que la muestra está sometida a una secuencia de pulsos de radio frecuencia, de forma tal que los datos de salida son función de dos parámetros

diferentes de tiempo, lo que conduce a un espectro en frecuencia de dos dimensiones, después de ser realizada la transformada de Fourier dos veces. Mediante la selección de secuencias de pulsos y valores apropiados para el tiempo de evolución, cada par de núcleos interactuantes en la molécula revela sus interconexiones, apareciendo estas en forma de "picos" fuera de la diagonal del espectro.

Tabla I
DESARROLLO CRONOLOGICO DE LA RMN

Periodo	Desarrollo de la Técnica
1945	Primeros experimentos en los laboratorios de F. Bloch y E. M. Poucell, en las universidades de Harvard y Standford, con protones en agua y parafina.
1951	Primer trabajo donde se resuelven las líneas protónicas del etanol.
1953	Venta del primer espectrómetro comercial de alta resolución.
1965	Desacoplamiento protónico con vista a la observación de espectros de ^{13}C .
Finales de la década del 60 y principios de la del 70	Desarrollo de algoritmos rápidos para realizar las transformadas de Fourier; acoplamiento de minicomputadoras al experimento y otras mejoras de tipo técnico, permitieron desarrollar los espectrómetros conocidos como de tercera generación. Estas mejoras impulsaron el desarrollo analítico para estudios a partir del núcleo de ^{13}C .
1978-1979	Primeros estudios de imágenes por RMN. Introducción de la técnica de altos campos con magnetos superconductores.
1980-1982	Técnicas de correlación y RMN de dos dimensiones. Primeras estructuras tridimensionales resueltas por RMN.

Estas interconexiones pueden ser ocasionadas por diferentes tipos de interacciones. En el caso en que los núcleos interactuantes se encuentran a distancias relativamente grandes (aproximadamente 4 \AA), la interacción entre los *spins* nucleares es indirecta o de tipo *J*, y la técnica utilizada en este caso es la conocida como espectroscopía correlacionada de dos dimensiones (COSY) utilizando el acronismo de la terminología inglesa *Two-Dimensional Correlation Spectroscopy*. En caso de que la interacción de los *spins* nucleares sea directa, se utiliza la correlación bidimensional del efecto *Overhauser Nuclear* (NOESY) (*Two-Dimensional Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*).

La técnica NOESY es particularmente eficiente para estudios de macromoléculas, pues un experimento sencillo de este tipo puede proveer los datos necesarios para elucidar la estructura de una proteína (Kumar *et al.*, 1980 y 1981) utilizando métodos de cálculos apropiados.

El efecto *Overhauser Nuclear* (NOESY) es la variación relativa de la intensidad de una línea de RMN correspondiente a un conjunto de núcleos, cuando otros conjuntos de núcleos interactuantes con los primeros es irradiado a causa del efecto del acoplamiento dipolar entre ellos. La intensidad de la línea en este caso depende de la distancia de los núcleos interactuantes y del tiempo de correlación efectivo Γ del movimiento rotacional del vector entre los núcleos.

El NOESY entre los átomos de hidrógeno puede ser observado para una distancia menor que $4,0 \text{ \AA}$ (Brains, W.C., *et al.*, 1981). Utilizando las ventajas del NOESY, es posible llegar a una determinación casi completa de la configuración no cristalina de las proteínas, al menos para aquellas constituidas por menos de 70-100 residuos aminoácidos (T. Havel y K. Wüthrich, 1984).

En fecha aún más reciente, se ha comenzado la utilización de otras ventajas de las técnicas de 2D, mediante la sustitución isotópica de núcleos de ^{14}N ó ^{13}C , para observar de manera selectiva los protones de proteínas de peso molecular de 20 000 (R. H. Griffey, 1985).

Por último, debemos mencionar que existen también trabajos muy interesantes para la determinación de la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos (Sanderson, M. R., 1983) por RMN.

REFERENCIAS

- BRAINS, W. C.; L. R. BOSCH; N. G. BROWN y K. WÜRTHRICH (1981). *Combined use of proton-proton Overhauser Enhancements and a Distance Geometry Algorithm for determination of polypeptide conformation*. Application to the Micelle-bound glucagen. *Biochem. Biophys. Acta* 667: 377.
- GRIFFEY, R. H.; G. REDFIELD; R. E. LOMIS y F. W. DAHLQUIST (1985). *Nuclear Magnetic Resonance Observation and dynamics of specific amide protons in T4 lysozyme*. *Biochemistry* 24: 817.
- HAVEL, T. y K. WÜRTHRICH (1984). *A distance geometry program for determining the structure of small protein and other macromolecular from nuclear magnetic resonance measurements of intramolecular ^1H - ^1H proximities in solution*. *Bulletin of Mathematical Biology* 46: 673.
- KERNS, D. R. (1982). *NMR studies of conformational states and dynamics of DNA*. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 15: 237.
- KUMAR, ANIL; R. R. ERMO y K. WÜRTHRICH (1980). *A Two Dimensional Nuclear Overhauser Enhancement (2DNOF) Experiment for the Elucidation of Complete proton-proton Cross relaxation networks in Biological macromolecules*. *Broche. Biophys. Res. Commun* 95: 1.
- KUMAR, ANIL; G. WAGNER; R. ERNST; K. WÜRTHRICH (1981). *Buildup rates of the NOESY measured by two dimensional protein magnetic resonance spectroscopy. Implication for studies of protein conformation*. *J. Am. Chem. Soc.* 103: 3654.
- MAOYO, K. H. (1985). *Epidermal Growth Factor m (EFG) from the mouse. Structural characterization by phosphorous NMR and Nuclear Overhauser Experiments at 500 MHz*. *Biochemistry* 23: 3960.
- SANDERSON M. R., et al. *Assignment of non exchangeable base proton and ^1H resonances of a deoxycytanucleoside heptaphosphate d (G-G-C-G-G-C-C) by using NOE*. *Nucleic Acid Research* 11: 3333.
- VAN BRIENT J. (1986). *Protein Architecture: designing from the ground up*. *Biotechnology*. 4: No. 4.
- WÜRTHRICH, K.; G. WIDER; G. WAGNER y W. J. BEAN (1982). *Sequential resonance assignments as a basis for determination of spatial protein structure by high resolution NMR*. *J. Mol. Biology*. 155: 311.