



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

00362

13

POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS

INSTITUTO DE FÍSICA

BÚSQUEDA DE CONFORMACIONES PARA UN  
FRAGMENTO DE ADN USANDO ANÁLISIS  
TEÓRICOS DE CONFORMACIÓN Y DATOS  
EXPERIMENTALES DE RMN EN SOLUCIÓN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS (FÍSICAS)

PRESENTA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

LIC. EN FÍS. MARÍA EUGENIA ROMERO GUZMÁN

NOTA: APARECE UN PUNTO Y RAYA EN TODA LA TESIS  
ASESOR: DR. VALERY I. POLTEV



posgrado en ciencias físicas  
u n a m

FEBRERO 2002



posgrado en ciencias físicas  
u n a m



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Índice

Introducción .....	1
1. Estructura y conformaciones del ADN .....	3
1.1 Estructura primaria del ADN .....	5
1.2 Estructura secundaria del ADN .....	7
1.3 Conformaciones A, B y Z del ADN .....	9
1.4 Parámetros de conformación de los nucleótidos .....	13
1.4.1 Ángulos de torsión en los nucleótidos .....	14
1.4.2 Plegamiento de la unidad de azúcar y concepto de pseudorotación .....	16
2. Fundamentos de la Mecánica Molecular .....	19
2.1 Funciones de potencial en la Mecánica Molecular .....	19
2.2 Potenciales para los enlaces y los ángulos .....	21
2.3 Potencial para los ángulos de torsión .....	22
2.4 Potenciales para las interacciones de van der Waals, del enlace de hidrógeno y electrostáticas .....	22
2.5 Parametrización .....	24
3. Programa CONAN .....	26
3.1 Método .....	26

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

3.1.1 Variables del plegamiento de la desoxirribosa .....	28
3.1.2 Cálculo de la energía potencial de un fragmento de ADN .....	29
4. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	31
4.1 Procesos de relajación en <i>RMN</i> .....	34
4.2 Efecto Nuclear Overhauser (NOE). .....	35
4.3 <i>RMN</i> en dos dimensiones.....	39
5. Resultados .....	44
5.1 Análisis teórico de conformación para el Octámero.....	46
5.2 Análisis de los resultados <i>NOE</i> experimentales .....	49
5.3 Análisis de las conformaciones obtenidas para el Octámero .....	54
5.4 Cálculos teóricos de las intensidades <i>NOE</i> para varias conformaciones del Octámero .....	58
5.5 Ajuste de las estructuras del Octámero a los datos <i>NOE</i> experimentales .....	60
Conclusión .....	65
Referencias.....	66

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# Introducción

El análisis detallado de la estructura y conformación de fragmentos del ADN nos permite entender los procesos biológicos básicos, tales como, la relación de la estructura con el reconocimiento por parte de las proteínas y las interacciones con el agua y otras moléculas. El problema de la dependencia de la estructura tridimensional del ADN sobre la secuencia nucleotídica [1] es uno de los problemas más importantes e interesantes de la biofísica molecular. Esta dependencia juega un importante papel en varios procesos que involucran el reconocimiento del ADN [2 – 4]. Los cambios pequeños en la geometría del ADN a lo largo de la cadena determinan muchos aspectos de su funcionamiento, incluyendo la expresión genética y la interacción con sus componentes activos. La oclusión específica de ciertas partes del material genético es uno de los posibles caminos de intervención dentro del metabolismo celular para combatir enfermedades tales como cáncer o sida.

Desafortunadamente, es muy difícil estudiar estos problemas cuantitativamente. Existen dos métodos experimentales para tales investigaciones, el estudio de rayos X de cristales de fragmentos de ADN y el estudio de resonancia magnética nuclear (*RMN*) de fragmentos en solución. La cristalografía de rayos X proporciona una visión detallada de la estructura, los resultados obtenidos se refieren al estado sólido, a la conformación de fragmentos de ADN que interactúan con muchos otros fragmentos, por lo que, estos resultados están influenciados por las fuerzas cristalinas de confinamiento [5].

El método de *RMN* proporciona una información más limitada ya que el rango de las distancias interprotónicas está limitado por el efecto Nuclear Overhauser (*NOE*), por lo que, no se puede obtener una determinación exacta de las propiedades globales del ADN [6]. Sin embargo, los datos obtenidos con este método se refieren a la conformación de fragmentos en solución acuosa, lo cual está relacionado muy de cerca con el funcionamiento biológico del ADN. El método de *RMN* ha sido muy utilizado en el refinamiento de conformaciones de ADN [7 – 9], incluyendo pares de bases modificadas [10, 11], hélices con pares de bases incorrectos [12, 13], complejos de ADN-proteína [14, 15] y otros.

Muchos estudios muestran desacuerdos entre las conformaciones derivadas por cristalografía de rayos X y las conformaciones en solución obtenidas con *RMN* [9, 16, 17], y a pesar de que han sido identificados un gran número de factores que contribuyen a la determinación exacta de estructuras de *RMN* [18 – 20], los datos experimentales que proporcionan estos dos métodos no son por sí solos suficientes para determinar con detalle la estructura tridimensional del ADN, pero pueden ser útiles para elegir

conformaciones desde un amplio rango de estructuras de baja energía, obtenidas por análisis teóricos de conformación. Este método, basado en los cálculos de la energía intermolecular, ha contribuido mucho al entendimiento de las posibles conformaciones que el ADN puede tener; predijo la existencia de varias familias de conformación [21] y la posible variabilidad dentro de una familia, antes que experimentalmente fueran confirmadas.

El análisis teórico de conformación es una parte inseparable de las técnicas modernas experimentales ya que es imposible extraer información de estructuras sin la construcción de modelos. Para la construcción de un conjunto teórico de conformaciones de mínima energía es necesario un campo de fuerzas teórico. La energía de las conformaciones dependerá de como se contruya y parametrize el campo. Para una conformación en particular, los diferentes campos de fuerza darán geometrías de equilibrio similares, pero su energía será diferente [22].

El objetivo de esta tesis fue construir un conjunto de conformaciones de mínima energía para una conformación *B* de un *octa-nucleótido* en solución, con la secuencia d(CTGTACAG)-d(GACATGTC). Para esta secuencia existen resultados experimentales de *RMN* en solución, lo que significa que se tienen las intensidades *NOE* experimentales entre pares de protones. Estas intensidades proporcionan un intervalo entre las distancias interprotónicas, pero no definen una conformación. Con análisis teóricos de conformación se buscará un conjunto de conformaciones cuyas intensidades *NOE* teóricas sean las más cercanas a las intensidades *NOE* experimentales. Y se propondrá una conformación como la más cercana a los resultados experimentales, con la finalidad de que los experimentalistas interesados en esta secuencia analicen los principales parámetros de conformación del *octa-nucleótido*.

Se inicia el trabajo realizando en el primer capítulo una exposición general de la estructura del ADN y de sus componentes. En el segundo capítulo se presentan los fundamentos de la Mecánica Molecular, los cuales permiten la construcción de un potencial semi-empírico con el cual se valoran las interacciones intermoleculares. En el tercer capítulo se describe el programa CONAN [24], con el cual se obtuvieron las conformaciones de mínima energía para el fragmento de ADN estudiado en este trabajo. En el cuarto capítulo se presenta una breve introducción a la *RMN* y se explica el efecto *NOE*. Y finalmente en el capítulo cinco se realiza el análisis de los resultados obtenidos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

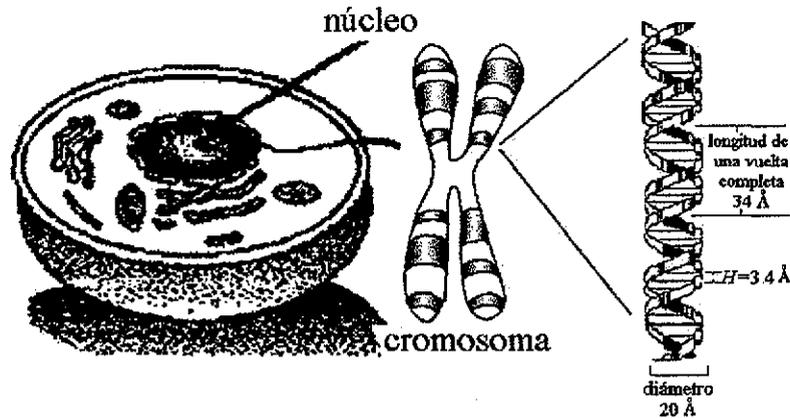
# Capítulo 1

## Estructura y conformaciones del ADN

A través de millones de años de evolución, la célula ha adquirido y perfeccionado una memoria genética donde esta registrada toda la información necesaria para fabricar, con un riguroso control de calidad, todas las proteínas requeridas para sus procesos vitales. Los ácidos nucleicos son las moléculas que contiene esta memoria genética. Las células contienen dos tipos de ácidos nucleicos: el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN), ambos son el material indispensable en el inventario molecular de todo organismo, desde el virus más simple hasta los seres humanos.

El ADN fue descubierto por el físico suizo Fritz Miescher en 1868 y los atributos esenciales del material genético fueron interpretados hace mas de cien años por los trabajos sobre plantas que realizó Gregorio Mendel, cuyos resultados le permitieron concluir que las características de los individuos son proporcionadas por el padre y la madre como resultado de la aparición de factores hereditarios, que posteriormente se identificaron como genes. Fue hasta 1953 cuando Francis Crick y Jim Watson [25] propusieron un modelo de su estructura, con el cual se sintetizó casi un siglo de investigaciones sobre la naturaleza del material genético y durante los últimos 40 años ha sido la base de la Biología Molecular. Hoy en día sabemos que el ADN es el portador de la información genética y que cada especie tiene un ADN específico. El ADN se encuentra en el núcleo de las células en forma compacta dentro de los cromosomas (*ver fig.1.1*), es una hebra muy angosta de forma helicoidal con un diámetro de 20 Å y con un giro cada 34 Å; puede llegar a tener una longitud total de 2m. A lo largo de su longitud contiene muchos segmentos denominados genes, los cuales pueden presentar formas alternativas que determinan la expresión de alguna característica particular o dar un tipo de célula; pero en esencia el ADN de los diferentes órganos y tejidos es el mismo para una misma especie.

El ADN se sintetiza por replicación, es decir, hace una copia de sí mismo, la cual proporciona ADN a las nuevas células formadas por división celular y a los nuevos organismos formados por reproducción. Cuando el ADN se replica, la copia va hacia la maquinaria que hace proteínas: los ribosomas. Estas copias de ADN son transportadas por el ARN desde los cromosomas a los ribosomas. El ARN es usualmente una molécula lineal y posee la capacidad de formar hélices. Existen tres clases de ARN, el ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt) y ARN ribosomal (ARNr).



**Figura 1.1** *Diagrama que representa al núcleo de la célula, en el cual se encuentran los cromosomas. Dentro de los cromosomas la información genética se encuentra en forma de una hélice muy angosta que puede llegar a medir dos metros.*

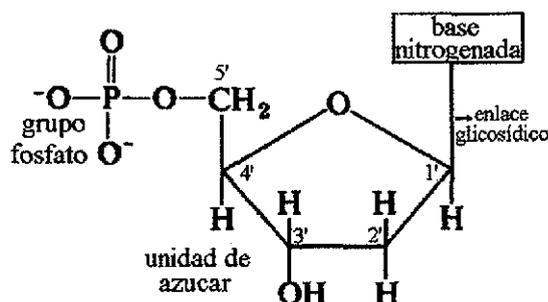
El ARNm es el encargado de llevar las instrucciones para hacer una proteína en particular desde los cromosomas a los ribosomas. La función principal del ARNt es transportar aminoácidos a los ribosomas [26], las células tienen por lo menos un tipo de ARNt para cada uno de los veinte aminoácidos [27]. El ARNr es parte integral de los ribosomas y en asociación con algunas proteínas ayuda a alinear una serie de moléculas de ARNt a lo largo de una cadena de ARNm, así, una serie de aminoácidos puede unirse para formar una proteína.

El proceso de replicación del ADN es casi perfecto, pero a veces se producen errores conocidos como mutaciones. Algunas mutaciones son perjudiciales, pueden causar la muerte o enfermedades llamadas hereditarias [27], mientras que otras ayudan a incrementar la capacidad de un organismo para sobrevivir [27]. La estructura y conformación del ADN aseguran su almacenamiento y transmisión; su estructura heterogénea, flexible y dinámica puede experimentar considerables cambios, por lo que es necesario un análisis detallado de las conformaciones del ADN para entender los procesos biológicos básicos, como la relación de la estructura con el reconocimiento por parte de las proteínas, las interacciones con moléculas de agua, proteínas y otras moléculas, etc. Por ejemplo, la interacción del ADN con moléculas de agua juega un papel importante en la formación de su estructura tridimensional [28], y se ha sugerido que los cambios en la conformación son reconocidos por proteínas y que existe un código de conformación de reconocimiento proteína-ADN durante el proceso de la transcripción [29]. En los últimos años se ha acumulado una cantidad considerable de datos nuevos sobre el rango de conformaciones que puede adoptar el ADN. Se han encontrado nuevas variedades de dos, tres y cuatro hélices, se ha aprendido acerca de su curvatura intrínseca, de sus transiciones dinámicas y de conformación, también muchos tipos de daños y deformaciones han sido investigados. En la

actualidad los conocimientos acerca de la estructura y función del ADN han sido introducidos dentro del área terapéutica y de diagnóstico de las principales enfermedades humanas.

## 1.1. Estructura primaria del ADN.

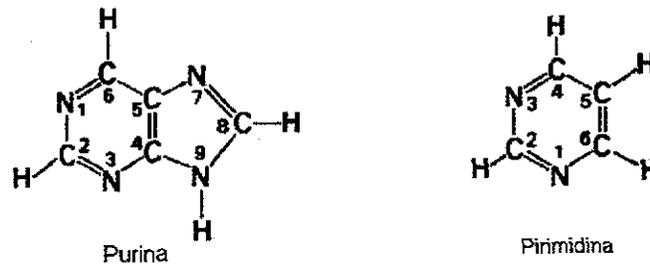
Las moléculas de ADN son polinucleótidos, es decir, moléculas muy grandes compuestas por muchas unidades de nucleótidos que se repiten; cada nucleótido (*fig.1.2*) está constituido por una base nitrogenada, una unidad de azúcar y un grupo fosfato, los cuales se componen principalmente de carbono (C), nitrógeno (N), oxígeno (O), hidrógeno (H) y fósforo (P). La combinación de una base y una unidad de azúcar se denominada un nucleósido. La unidad de azúcar del ADN es la desoxirribosa.



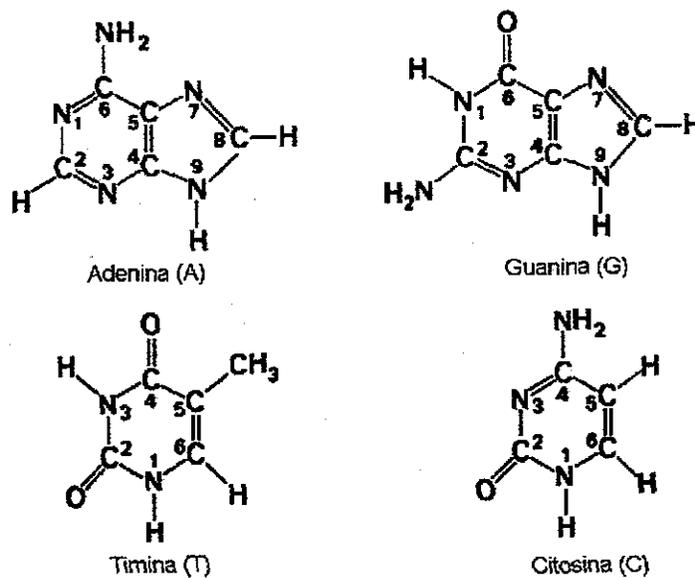
**Figura 1.2** Un nucleótido de ADN compuesto por una base nitrogenada, una unidad de azúcar desoxirribosa y un grupo fosfato P. La numeración de 1' a 5' en la unidad de azúcar, representa a los carbonos C1', ..., C5', respectivamente.

Las bases nitrogenadas se derivan de dos compuestos fundamentales: la pirimidina y la purina (*fig.1.3*). En el ADN se encuentran dos purinas: adenina (A) y guanina (G), y dos pirimidinas: timina (T) y citosina (C), (*fig.1.4*). Las bases son moléculas rígidas y planas, tienen varios centros hidrofílicos (átomo protón-aceptor y protón-donador) que permiten la formación de enlaces de hidrógeno (N-H...N(O)). La diferente posición de los hidrógenos donadores y los grupos aceptores, da a las bases la identidad estructural única que les permite servir como información genética. Los átomos de hidrógeno de los grupos amino (NH<sub>2</sub>) proveen enlaces de hidrógeno donadores, mientras que los oxígenos del grupo carbonil (C=O) y los nitrógenos proveen enlaces de hidrógeno aceptores [30,31]. La base y la unidad de azúcar se encuentran unidas por un enlace covalente entre un nitrógeno de la base purínica (N9) (pirimidínica (N1)) y el carbono C1' de la unidad de azúcar, llamado enlace glicosídico (ver *fig.1.2*). Al unirse varios nucleótidos por medio de grupos hidroxilo (OH) en la posición 3' de un nucleótido y el grupo 5' del nucleótido siguiente, se forma una secuencia de nucleótidos denominada polinucleótido (poli ó cadena de polinucleótidos) (*fig.1.5*). La secuencia de los nucleótidos en la doble hélice determina la *estructura primaria* del ADN, la cual puede escribirse

basándose en el orden diferente de las bases, ignorando las unidades de azúcar y los grupos fosfatos. Se puede empezar por el extremo 5' libre (no ligado a otro nucleótido) y seguir hacia el extremo que tiene el grupo hidróxilo 3' libre (*fig.1.5*), dirección de 5' a 3' (o también de 3' a 5'), como por ejemplo en la *figura 1.5* la secuencia es *ATGC*.

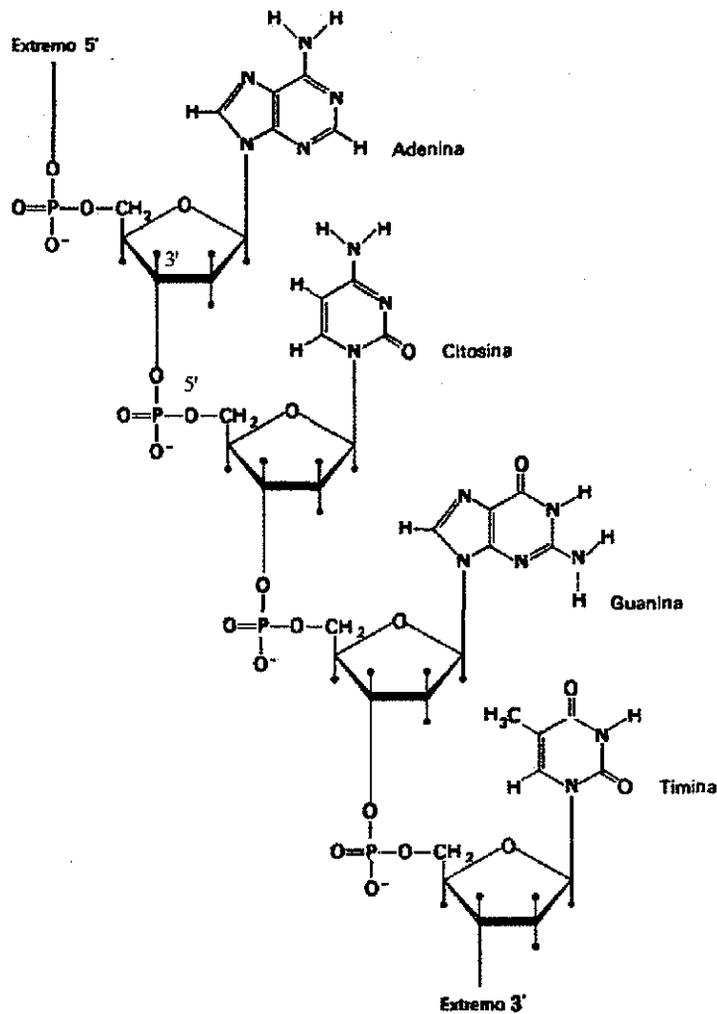


**Figura 1.3** *Compuestos fundamentales de los cuales se derivan las bases nitrogenadas del ADN, la purina y la pirimidina.*



**Figura 1.4** *Bases nitrogenadas que componen el ADN. Notar que las purinas (A y G) se enumeran de manera distinta a las pirimidinas (T y C).*

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



**Figura 1.5** Fragmento de un polinucleótido, compuesto por la unión de nucleótidos de ADN. Los nucleótidos se unen por medio de grupos OH en la posición 3' de un nucleótido y el grupo 5' del nucleótido siguiente. La secuencia ACGT tiene dirección de 5' a 3'.

## 1.2. Estructura secundaria del ADN.

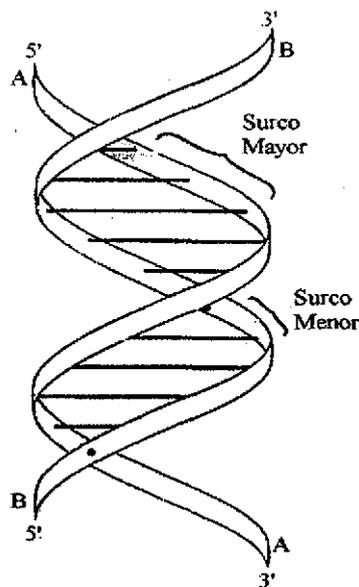
La *estructura secundaria* del ADN fue establecida por los trabajos de James D. Watson y Francis Crick en 1953 [25]. El modelo propuesto del ADN se basó en numerosos estudios de difracción de rayos X y muestra al ADN como una doble hélice con dos cadenas de polinucleótidos enrolladas sobre el mismo eje y unidas por puentes de hidrógeno entre las bases. La molécula se asemeja a una escalera girando sobre una columna cilíndrica imaginaria (*fig.1.6*). En esta analogía los peldaños representan las bases nitrogenadas provenientes de cada una de las cadenas de la doble hélice. Los pasamanos de la escalera representan a las unidades de azúcar y a los grupos fosfatos.

Las bases se unen de dos formas: adenina con timina,  $A : T$  y guanina con citosina,  $G : C$ , estos

pares se llaman pares de bases de Watson-Crick (W-C) (*fig.1.7*) y a esta unión de las bases se le denomina complementariedad. El par G:C tiene tres enlaces de hidrógeno y el par A:T tiene dos. Los pares de W-C son estables y del mismo tamaño por lo que se adaptan fácilmente dentro de la doble hélice, se encuentran en el interior de la cadena mientras que las unidades de azúcar y los fosfatos se encuentran en el exterior.

El modelo también establece que las cadenas de polinucleótidos corren en direcciones opuestas, por lo que son antiparalelas. Una de las cadenas corre en dirección de 5' a 3', y la cadena complementaria de 3' a 5' (*fig.1.6*). La doble hélice tiene su giro hacia la derecha y al modelo con todas estas características se le conoce como la forma B del ADN. La doble hélice también exhibe dos canales o surcos alrededor de su superficie de diferente ancho y profundidad, son el surco mayor y el surco menor (*fig.1.6*).

La formación de otros pares de bases distintos a A:T y G:C, significa un error en la replicación del ADN, la cual puede resultar en la siguiente replicación como una mutación [28]. Durante la replicación del ADN las bases están normalmente determinadas por el apareamiento de bases de W-C (A:T y G:C), no sólo por ser estables, sino por que dan una doble hélice con cadenas de azúcar-fosfato antiparalelas en la secuencia de las bases.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Figura 1.6** Representación de la doble hélice del ADN propuesta por Watson y Crick. Dos cadenas polinucleotídicas A y B, se enrollan sobre el mismo eje imaginario, asemejando una escalera de caracol, donde los peldaños (líneas) representan a las bases y los pasamanos (bandas) a las unidades de azúcar y a los grupos fosfato. La cadena A (B) tiene la dirección 5'→3' (3'→5'). También se ejemplifican los surcos mayor y menor.

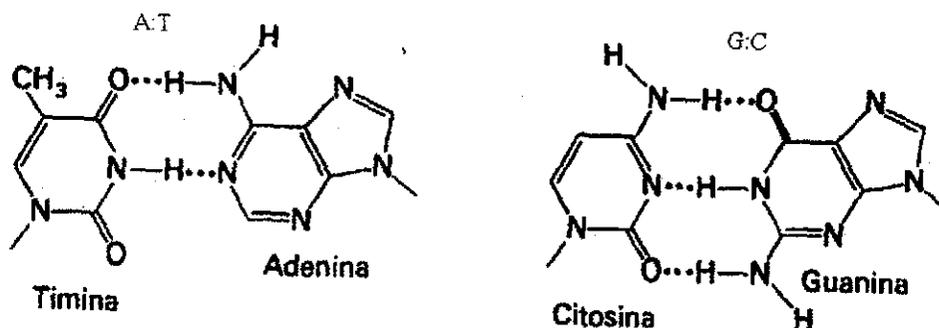
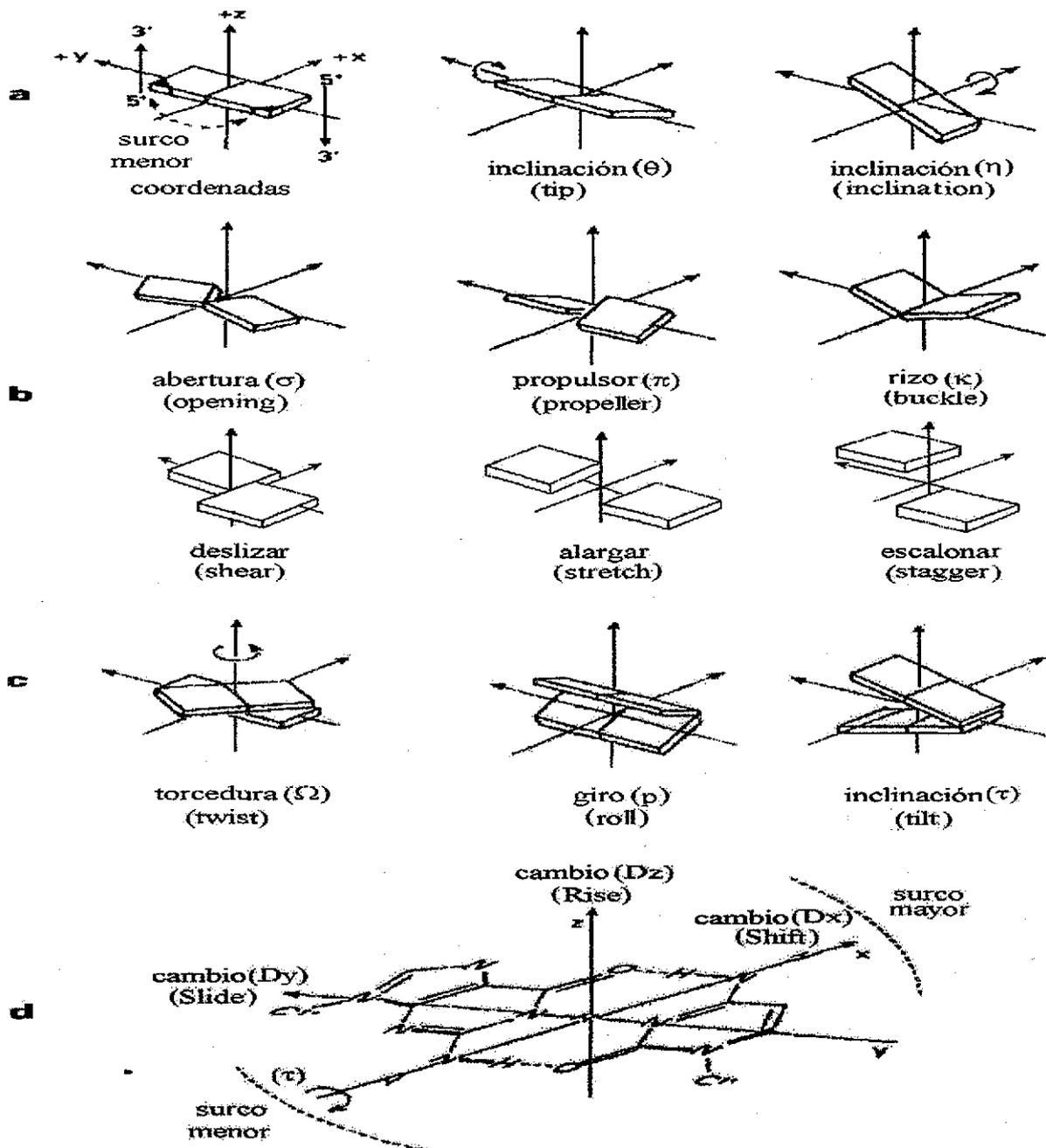


Figura 1.7 Pares de bases de W-C: A:T y G:C. El par A:T tiene dos enlaces de hidrógeno y el par G:C tiene tres.

### 1.3. Conformaciones A, B y Z del ADN.

La doble hélice del ADN es una estructura heterogénea flexible y dinámica, la cual pueden experimentar cambios mutuos considerables. Esta definición da como resultado una gran variedad de conformaciones. Existen hélices regulares que siguen el modelo de W-C, esto es, hélices con pares de bases A:T y G:C, antiparalelas y con giro hacia la derecha. También podemos encontrar hélices irregulares (que no siguen el modelo de W-C) y hélices con pares de bases incorrectos. Las variaciones en la estructura secundaria del ADN pueden ser influenciadas por la secuencia de las bases, por ejemplo, las secuencias de cadenas de polinucleótidos de Adenina (A) y Timina (T): d(A)·d(T), es una estructura que prefiere la forma denominada B, mientras que la secuencia d(G)·d(C) la forma denominada A; [28]. Las diferentes conformaciones también se deben a la posición relativa de las bases, un par de bases puede variar su orientación relativa a sus compañeras por rotación alrededor de los ejes x, y o z, los pares de bases pueden moverse en conjunto y también las bases de un par pueden tener movimientos opuestos (fig.1.8). Las conformaciones de ADN se clasifican en la familia A (ADN-A), la familia B (ADN-B) y la forma Z (ADN-Z) [30].

La familia ADN-A se forma para una humedad relativamente pequeña (hasta un 70%) [27], sigue el modelo de W-C con una doble hélice derecha y antiparalela. Las unidades de azúcar son paralelas al eje de la hélice y las columnas de fósforos se encuentra en el exterior de la cadena. Las bases se encuentran desplazadas 4.5 Å fuera del eje de la hélice, esto crea un hueco en el centro del eje de 3 Å de diámetro (ver fig.1.9). Hay 11 bases por cada giro helicoidal y están inclinadas 20°. Su surco mayor es profundo y estrecho, y el surco menor es superficial y amplio [30].



**Figura 1.8** Diagramas que ilustran los movimientos de las bases, sus nombres corresponden a designaciones internacionales. (a)-(c) Muestran rotaciones locales, las rotaciones son en los ejes x, y, z, de derecha a izquierda, respectivamente. a) Bases de pares moviéndose juntos. b) Bases de un par moviéndose en forma opuesta. c) Movimientos entre dos pares de bases. d) Movimientos de pares de bases relativos al eje de la hélice y a los surcos mayor y menor.

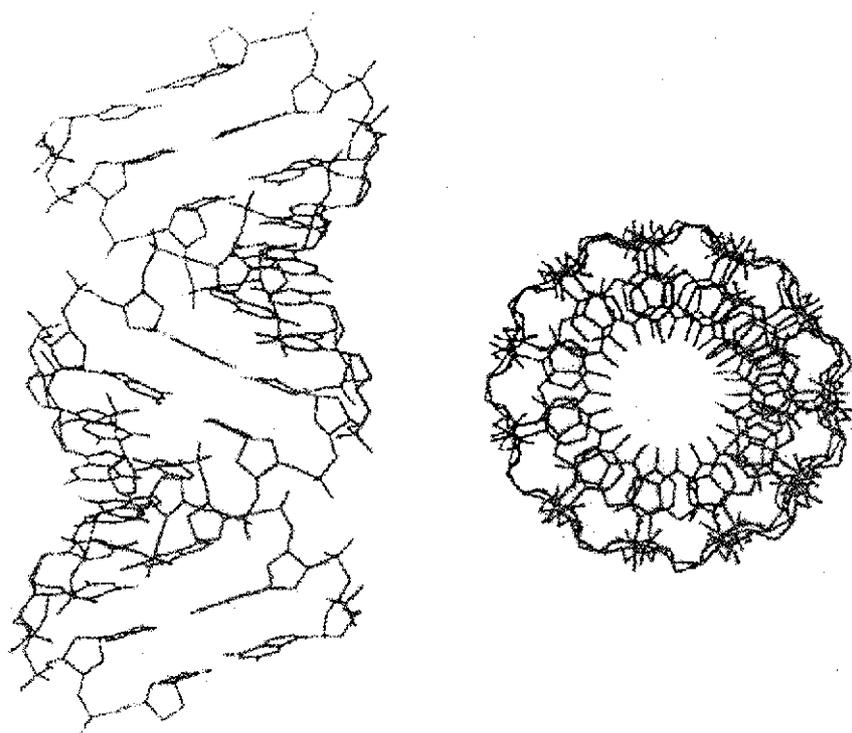
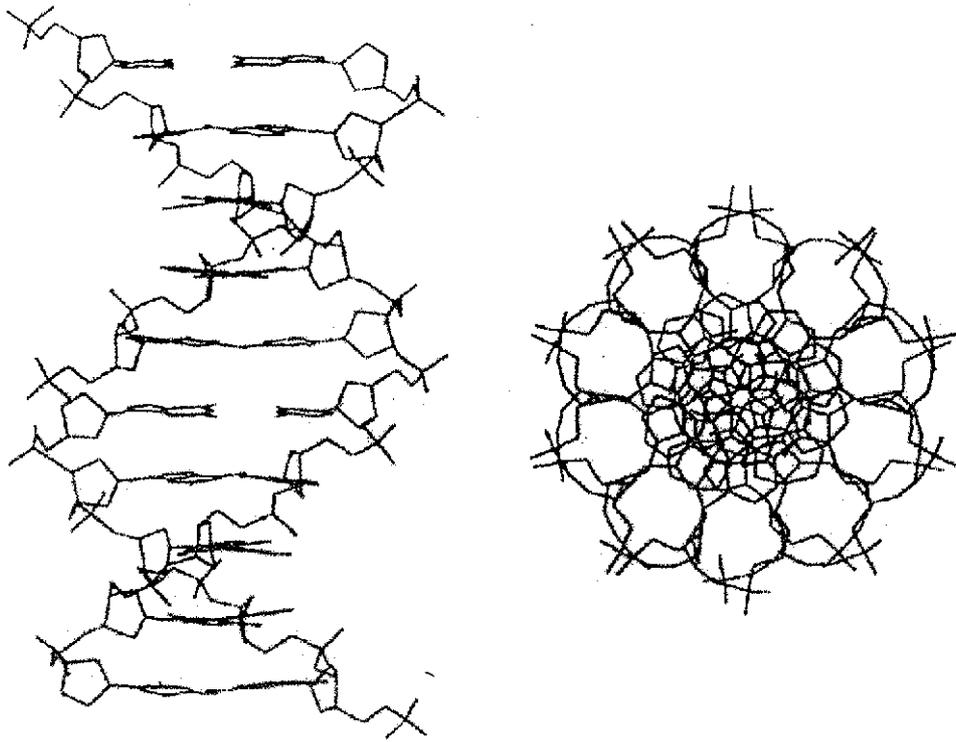


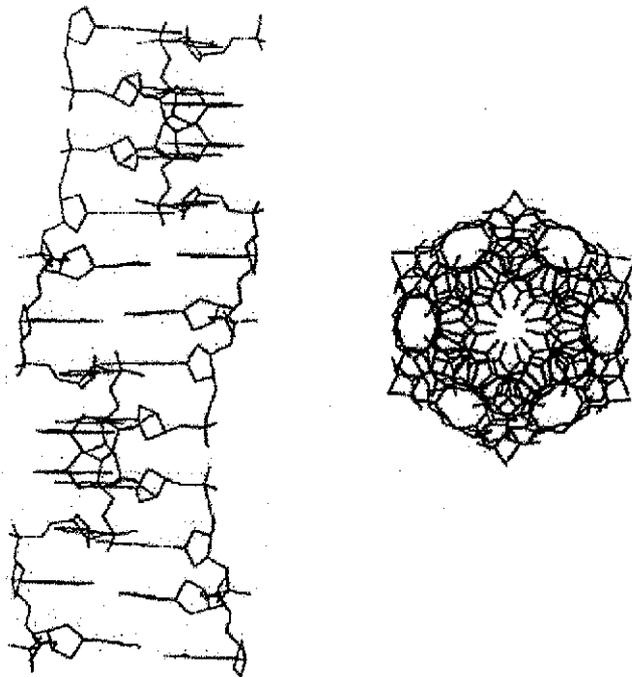
Figura 1.9 Ejemplo de una conformación ADN-A

La familia ADN-B se forma cuando la humedad es alta (92%) [30], sigue el modelo de W-C con una doble hélice derecha y antiparalela (*ver fig.1.10*). Los pares de bases se sitúan sobre el eje de la hélice, por lo que los surcos (mayor y menor) son de profundidad similar. Las bases se amontonan sobre sus vecinas en la misma cadena y son perpendiculares al eje de la hélice. Tiene 10 bases por cada giro helicoidal ligeramente inclinadas. Los fósforos de la misma cadena están un poco más separados que en el ADN-A. La estabilidad estructural de la familia *B* esta ligada a su alta humedad y es muy flexible. La espiral doble cambia constantemente dentro de los límites de las familias *A* y *B*, y es posible el paso de una familia a otra [27].

La forma ADN-Z (*fig.1.11*) se presenta en altas concentraciones de sal. También es una doble hélice antiparalela; pero sus dos cadenas corren en sentido contrario a las manecillas del reloj, son izquierdas. Los pares de bases de W-C se mantienen, tiene 12 pares de bases por cada vuelta helicoidal y sus fósforos tienen una apariencia de zig-zag. Esta forma de ADN es más favorable para secuencias d(G)-d(C). El surco menor es estrecho y muy profundo; pero el surco mayor llega a ser tan superficial que las partes inaccesibles de las bases C y G están expuestas [30].



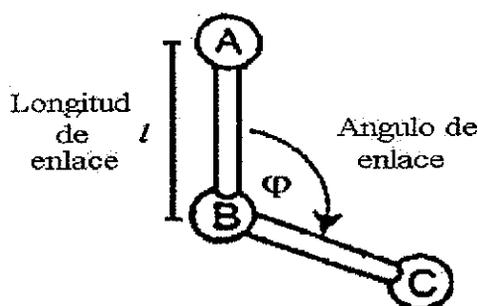
**Figura 1.10** *Ejemplo de una conformación ADN-B*



**Figura 1.11** *Ejemplo de una conformación ADN-Z*

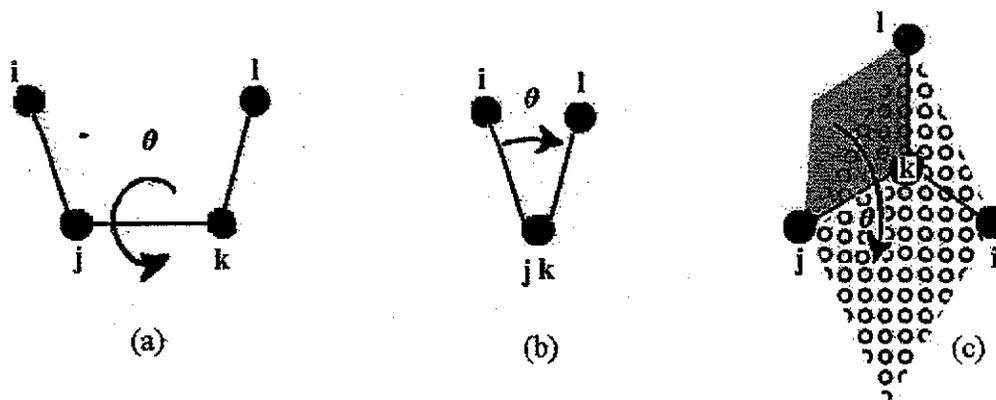
## 1.4. Parámetros de conformación de los nucleótidos.

La estructura tridimensional del ADN puede ser caracterizada por longitudes de enlace, ángulos de enlace y rotaciones de los grupos de átomos alrededor de los enlaces [32]. La *longitud de enlace*  $l$  (fig.1.12) es la distancia entre los centros de dos átomos conectados por un enlace. El *ángulo de enlace*  $\varphi$ , es la medida de la abertura que se forma cuando una secuencia de tres átomos se encuentran conectados por enlaces (fig.1.12).



**Figura 1.12** Diagrama que muestra la longitud de enlace  $l$  y el ángulo de enlace  $\varphi$ .

Consideremos cuatro átomos,  $i j k l$ . Si los cuatro átomos son conectados por enlaces  $i-j-k-l$ , el *ángulo de torsión*  $\theta$  se llama *ángulo de torsión propio* (fig. 1.13 (a) y (b)) y se define como el ángulo entre las proyecciones de los enlaces cuando se ve a lo largo del enlace central, en cualquiera de las dos direcciones  $j \rightarrow k$  o  $k \rightarrow j$ . Si el átomo  $k$  se enlaza a  $i, j$  y  $l$ , el *ángulo de torsión*  $\theta$  se llama *ángulo de torsión impropio* (fig. 1.13 (c)) y es el ángulo entre los planos  $ijkl$  y  $jli$ .



**Figura 1.13** Definición de ángulos de torsión  $\theta$ . (a) Ángulo de torsión propio ( $i-j-k-l$ ) con respecto al enlace central  $j-k$ . (b) Vista a lo largo de  $j \rightarrow k$ ,  $\theta$  es el ángulo de torsión entre las proyecciones de los enlaces. (c) Ángulo de torsión impropio, definido como el ángulo entre los planos  $ijkl$  y  $jli$ .

### 1.4.1 Ángulos de torsión en los nucleótidos.

En la *figura* 1.14 se muestran los ángulos de torsión para el  $n$ -ésimo nucleótido de una cadena polinucleotídica y en la *tabla* 1.1 se especifican los átomos involucrados. La columna de azúcar-fosfato esta constituida por la secuencia de los átomos  $P \rightarrow O5' \rightarrow C5' \rightarrow C4'$ , etc., y se define por los ángulos de torsión  $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon, \zeta$ , en orden alfabético. Los ángulos de torsión de la unidad de azúcar son denotados por  $\nu_0, \nu_1, \nu_2, \nu_3$  y  $\nu_4$  y la orientación de la base relativa a la unidad de azúcar esta dada por el ángulo de torsión glicosídico  $\chi$ .

Las bases pueden tomar dos principales orientaciones del enlace glicosídico, llamadas conformaciones *syn* ( $0^\circ$ ) y *anti* ( $180^\circ$ ) y se definen por el ángulo de torsión  $\chi$  (*fig.*1.15 y *tabla* 1.1). En la *figura* 1.15 se muestran como ejemplos las conformaciones *syn* y *anti* de la dexosiadenosina.

**Tabla 1.1**

*Ángulos de torsión y los átomos involucrados en una unidad de nucleótido  $n$ . Para la numeración de los átomos ver la figura 1.14.*

Ángulos de torsión	Átomos involucrados
$\alpha$	$(n-1)O3' - P - O5' - C5'$
$\beta$	$P - O5' - C5' - C4'$
$\gamma$	$O5' - C5' - C4' - C3'$
$\delta$	$C5' - C4' - C3' - O3'$
$\epsilon$	$C4' - C3' - O3' - P$
$\zeta$	$C3' - O3' - P - O5'(n+1)$
$\chi$	$C2' - C1' - N1 - C6$ <i>pirimidinas</i> $C2' - C1' - N9 - C8$ <i>purinas</i>
$\nu_0$	$C4' - O4' - C1' - C2'$
$\nu_1$	$O4' - C1' - C2' - C3'$
$\nu_2$	$C1' - C2' - C3' - C4'$
$\nu_3$	$C2' - C3' - C4' - O4'$
$\nu_4$	$C3' - C4' - O4' - C1'$

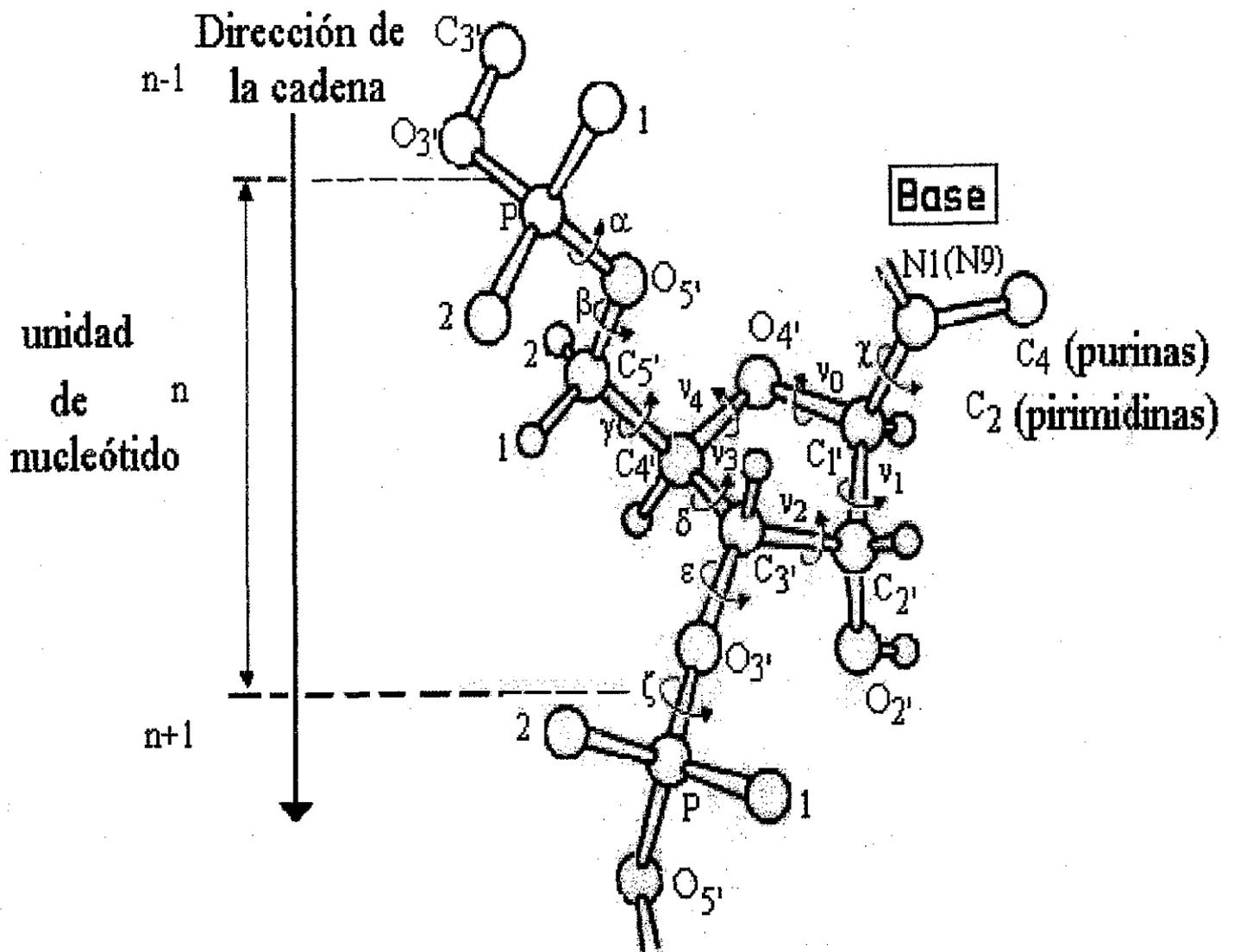


Figura 1.14 Ángulos de torsión para el  $n$ -ésimo nucleótido de una cadena polinucleotídica.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  representan a los ángulos de torsión de la columna azúcar-fosfato;  $\nu_0$ ,  $\nu_1$ ,  $\nu_2$ ,  $\nu_3$  y  $\nu_4$  representan a los ángulos de torsión de la unidad de azúcar y  $\chi$  es el ángulo de torsión glicosídico.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

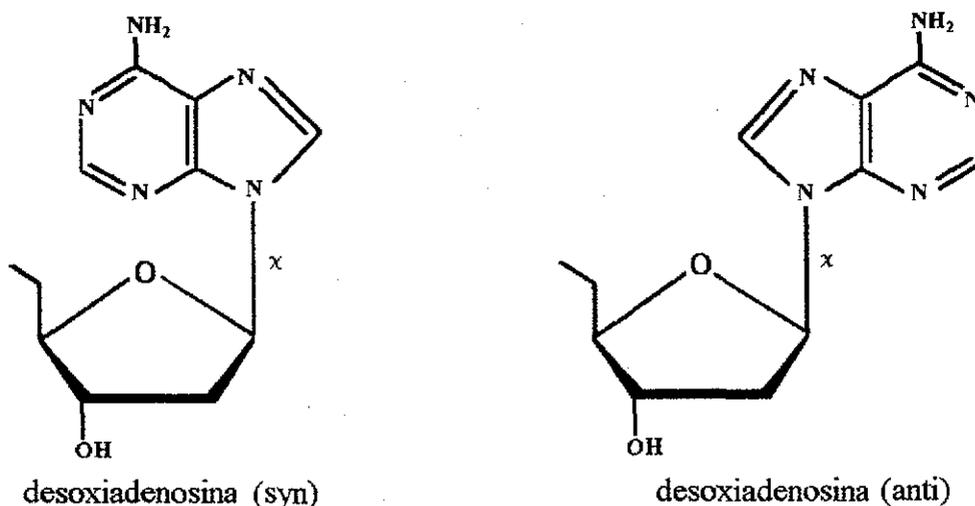


Figura 1.15 Diagramas que ilustran las dos principales orientaciones del enlace glicosídico  $\chi$ , *syn* y *anti*.

#### 1.4.2 Plegamiento de la unidad de azúcar y concepto de pseudorotación.

En esta sección se caracterizarán las diferentes conformaciones que puede tomar la unidad de azúcar. La unidad de azúcar esta compuesta principalmente por un anillo de 5 átomos, al que se denomina furanosa (ver fig.1.2). Los cinco miembros de la unidad de azúcar no son planos, algunos de sus átomos adquieren una forma plegada. En general, se pueden clasificar los plegamientos en dos tipos, *E* y *T*. En la forma *E*, cuatro átomos se encuentran en el mismo plano y el quinto se desplaza fuera de este (fig.1.16). En la forma *T*, dos átomos adyacentes se desplazan en dirección opuesta, fuera del plano que forman los tres átomos restantes (fig.1.16). En la forma *T* los desplazamientos rara vez tienen la misma magnitud, la desviación más grande da lugar a un plegamiento mayor y la desviación más pequeña a un plegamiento menor. Otra característica importante de la unidad de azúcar es que el plegamiento se puede dar hacia la dirección en que se encuentra el átomo  $C5'$ . El átomo que forma el pliegue y se desplaza en esta dirección se le denomina *endo*. Si lo hace en dirección opuesta se denomina *exo*, por ejemplo,  $C3'$ -*endo*,  $C2'$ -*exo*.

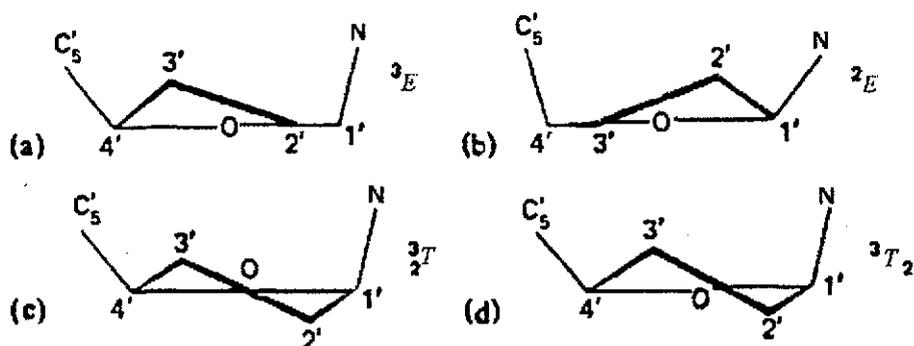


Figura 1.16 Ejemplos de plegamientos de la unidad de azúcar. a)  $C3'$ -endo  $E$ , b)  $C2'$ -endo  $E$ , c) un simétrico  $C3'$ -endo- $C2'$ -exo  $T$  y d) un antisimétrico  $C3'$ -endo(mayor)- $C2'$ -exo(menor)  $T$ .

Las conformaciones  $E$  y  $T$  describen el plegamiento de la unidad de azúcar en forma aproximada, en general no son considerados modos intermedios de la forma  $E$  o  $T$ . Por lo que el plegamiento de los cinco miembros de la unidad de azúcar se trata analíticamente con el concepto de pseudorotación [33]. Los cambios de la conformación de la unidad de azúcar no proceden por planos intermedios, existe un número infinito de conformaciones que pueden ser descritas en términos del ángulo máximo de torsión (grado de plegamiento)  $\nu_{max}$  y por el ángulo fase de pseudorotación,  $P$  (fig.1.17). La amplitud del plegamiento ( $\nu_{max}$ ) de la desoxirribosa no depende del tipo de base ni de los ángulos de torsión  $\chi$  y  $\gamma$  (fig.1.14) [33]. En nucleótidos el ángulo fase de pseudorotación  $P$ , es calculado de acuerdo a los ángulos de torsión de la unidad de azúcar  $\nu_0, \nu_1, \nu_2, \nu_3$  y  $\nu_4$  (fig.1.14, tabla 1.1) como en [34]:

$$\tan P = \frac{(\nu_4 + \nu_2) - (\nu_1 + \nu_3)}{2\nu_0(\sin 36^\circ + \sin 72^\circ)} \quad (1.1)$$

El ángulo fase  $P=0^\circ$  es definido tal que, el ángulo  $\nu_2$  es máximamente positivo, correspondiente a una forma  $C3'$ -endo- $C2'$ -endo  $T$  ( ${}^3_2T$ ). Su imagen  ${}^2_3T$ , es representada por  $P=180^\circ$ . Dado el ángulo fase  $P$ , los cinco ángulos de torsión están relacionados por:

$$\nu_j = \nu_{max} \cos(P + j \cdot \varphi), \quad (1.2)$$

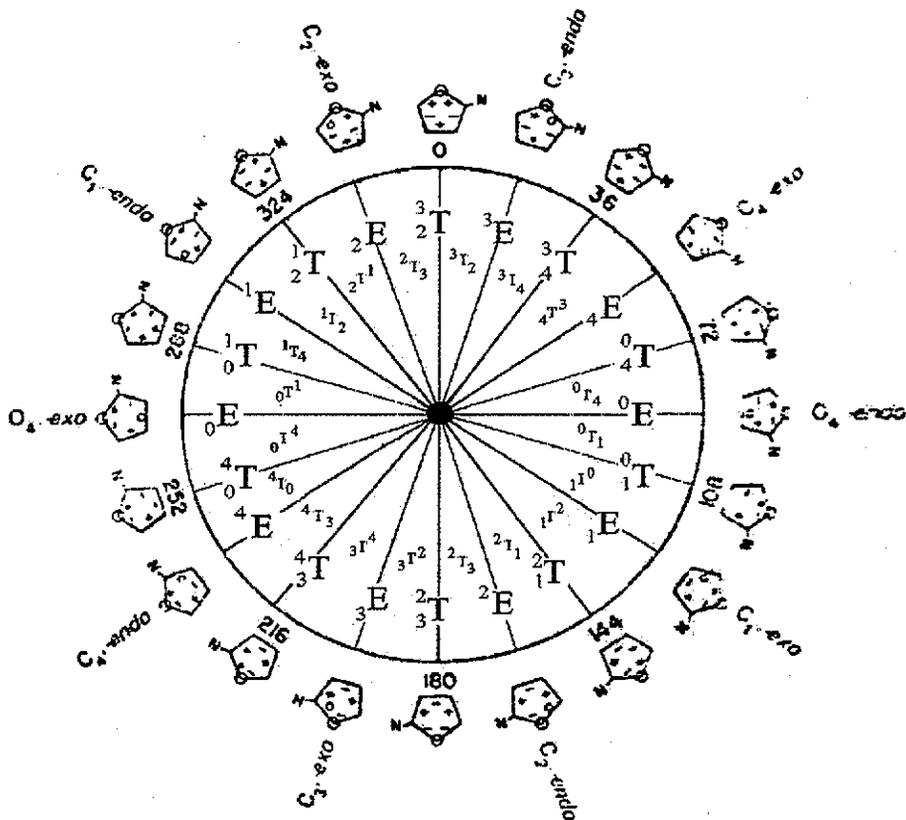
donde  $j=0$  a  $4$  y  $\varphi=144^\circ$ . El ángulo máximo de torsión  $\nu_{max}$  es derivado tomando  $j=0$ :

$$\nu_{max} = \frac{\nu_0}{\cos P} \quad (1.3)$$

De la Ec[1.2] se deriva fácilmente la Ec[1.1].

En cada ángulo fase  $P$ , la suma de los cinco ángulos es cero:

$$\nu_0 + \nu_1 + \nu_2 + \nu_3 + \nu_4 = 0. \quad (1.4)$$



**Figura 1.17** Ciclo de pseudorotación de la unidad de azúcar. Los valores de  $P$  se dan en múltiplos de  $36^\circ$ . Las formas alternativas  $E$  y  $T$  se dan cada  $18^\circ$ . Después de rotar  $180^\circ$  las imágenes de las posiciones iniciales son encontradas. Sobre la periferia del círculo las unidades de azúcar indican los signos de los ángulos de torsión, positivo (+), negativo (-) y 0 representa el ángulo de  $0^\circ$ . Por ejemplo, en la designación  ${}^3T_2$ , los superíndices (subíndices) indican átomos *exo* (*endo*), el 3 (2) denota al átomo  $C3'$  ( $C2'$ ) y los números colocados antes (después) de  $T$  denotan al plegamiento mayor (menor). En el caso de una forma  $E$  con plegamiento definido por  $C3' - \text{exo}$ , esta conformación se denotar por  ${}^2E$ .

Al ser el anillo de azúcar en los nucleósidos sustituido asimétricamente, el ángulo fase de pseudorotación calculado determina que las estructuras de nucleósidos y nucleótidos no se distribuyen uniformemente sobre el ciclo de pseudorotación [34]. Están centradas en dos dominios  $C3' - \text{endo}$ ,  $P = -1^\circ$  a  $34^\circ$ , y  $C2' - \text{endo}$ ,  $P = 137^\circ$  a  $194^\circ$ . Los plegamientos de las formas  $C3' - \text{endo}$  y  $C2' - \text{endo}$  son preferidos por que las interacciones entre átomos que no están enlazados son mínimas [33]. El paso de conformaciones  $C3' - \text{endo} - C2' - \text{endo}$  se realiza a través de una conformación denominada  $O4' - \text{endo}$  ( $P \sim 90^\circ$ ) y en solución esta en rápido equilibrio. La forma ADN-A tiene sus unidades de azúcar en la forma  $C3' - \text{endo}$ , mientras que ADN-B en la forma  $C2' - \text{endo}$  y el paso entre estas dos familias es a través de la forma  $O4' - \text{endo}$  [33].

## Capítulo 2

# Fundamentos de la Mecánica Molecular

El método de mecánica molecular (MM) es una consecuencia natural de las viejas ideas sobre enlaces entre átomos y moléculas, y las fuerzas de van der Waals entre átomos no enlazados. Aún cuando estas ideas aparecieron alrededor de 1930, intentos de utilizar el método no surgieron sino hasta 1946. En este año fueron publicados tres artículos fundamentales, *Hill* [35] propuso que las interacciones de van der Waals junto con las deformaciones de enlaces y ángulos podrían ser utilizadas para minimizar energías y obtener estructuras de equilibrio. En forma simultánea aparecieron los artículos de *Dostrovsky* [36] y *Westheimer* [37]. Este último, el más importante, tuvo éxito en mostrar que su formulación de MM podría ser utilizada para obtener información relacionada con la estructura de los sistemas. Con el advenimiento de las computadoras alrededor de 1950 y de ahí en adelante, el interés en aplicar el método se incrementó rápidamente a tal grado que en la actualidad la MM es uno de los métodos estándar para realizar cálculos moleculares, principalmente de moléculas con un número muy grande de átomos, como el ADN y las proteínas.

La MM define un método de cálculo que proporciona información acerca de las estructuras y energías de las moléculas de la manera más práctica posible [38]. El rango de aplicación de la MM incluye: (1) El estudio de moléculas que contienen miles de átomos, como moléculas orgánicas, oligonucleótidos y péptidos. (2) Moléculas en el vacío o con ambientes de solventes explícitos. (3) Estados base únicamente.

La MM predice la energía asociada con alguna conformación basándose en los siguientes principios:

- El núcleo y los electrones son considerados como un todo dentro del átomo.
- El átomo se considera como una partícula de forma esférica de radio  $r$  y con una carga neta.
- Las interacciones se describen por medio de resortes y potenciales clásicos.
- Las interacciones determinan la distribución espacial del átomo como partícula y su energía.

### 2.1. Funciones de potencial en la mecánica molecular.

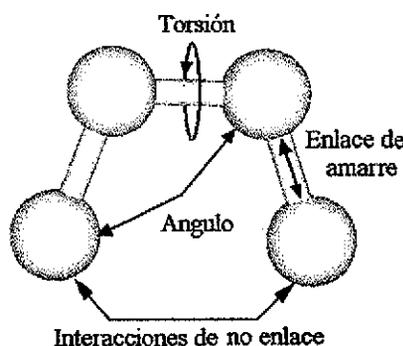
La MM utiliza como modelo una molécula compuesta de átomos unidos por enlaces. Utilizando parámetros como longitudes de enlace, ángulos, y permitiendo interacciones entre átomos no enlazados, la MM construye una expresión de *energía potencial*, la cual no solo será función de las posiciones atómicas, sino también de los parámetros requeridos para describir el comportamiento de diferentes átomos y enlaces. Minimizando esta expresión, el método de MM predice las geometrías de equilibrio

y las energías. El modelo de potencial planteado tiene varias ventajas. Primero, la energía puede ser calculada rápidamente para una configuración de átomos dada. Esto hace posible la determinación de la estabilidad relativa de las distintas conformaciones moleculares. Segundo, se puede obtener fácilmente la expresión analítica de las derivadas espaciales de la energía. Entonces, las fuerzas que actúan sobre los átomos y los gradientes de éstas fuerzas pueden ser calculados. Finalmente, porque la energía potencial puede ser analizada usando conceptos estructurales simples.

En general, la forma del potencial es desconocida, sin embargo, se puede modelar seleccionando un conjunto de funciones de potencial llamado *campo de fuerzas*, el cual se expresa en términos de las coordenadas internas de las moléculas. Para una molécula, el campo de fuerzas se puede escribir como una serie de potencias que involucran el estiramiento de los enlaces, las variaciones en los ángulos, las atracciones y repulsiones de van der Waals entre átomos no enlazados uno con el otro a un átomo común (*fig.2.1*), interacciones de átomos capaces de formar enlaces de hidrógeno y las interacciones electrostáticas. Sumando todas estas contribuciones se obtiene que [38]:

$$V = \sum V_{\text{estiramiento}} + \sum V_{\text{curvatura}} + \sum V_{\text{torsión}} + \sum V_{\text{van der Waals}} + \sum V_{\text{enlace de hidrógeno}} + \sum V_{\text{electrostático}} \quad (2.1)$$

La suma se extiende sobre todos los enlaces, ángulos de curvatura, ángulos de torsión, interacciones de van der Waals, enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas. La suma de todos éstos términos se le denomina *energía estérica*  $V$  de una molécula. Las expresiones explícitas para cada término en la *Ec. [2.1]* define lo que es llamado un *campo de fuerzas mecánico-molecular*, entonces las derivadas de la función de energía potencial determina la fuerza sobre los átomos. Cada término de la *Ec. [2.1]* contendrá parámetros que se requieren para describir el comportamiento de diferentes átomos y enlaces.



**Figura 2.1** Diagrama que representa los parámetros utilizados en la mecánica molecular.

Para encontrar un mínimo de energía local de una molécula se toma la derivada de la energía ( $Ec.$  [2.1]) con respecto a las coordenadas internas. Existen varios métodos que permiten la localización de los estados restringidos de una molécula o las conformaciones de mínima energía [38, 39]. Las técnicas más sofisticadas para minimizar la energía utilizan la primera y segunda derivada. La minimización de la  $Ec.$  [2.1] produce las geometrías de equilibrio de una conformación en particular. Es necesario enfatizar que el valor numérico de la energía estérica de equilibrio de una conformación no tiene un significado físico por si mismo. El nivel cero de  $V$  corresponde a una molécula ficticia en la cual todas las longitudes de enlace y ángulos tiene sus valores de referencia, y las interacciones electrostáticas y de van der Waals están ausentes. También es importante mencionar que diferentes campos de fuerza darán geometrías de equilibrio similares para una conformación en particular, pero la energía estérica será diferente para tal conformación. Esto se debe a que la energía estérica depende de como fue construido y parametrizado el campo de fuerzas.

## 2.2. Potenciales para los enlaces y los ángulos.

En la mecánica molecular los átomos de una molécula pueden pensarse unidos entre si por resortes mutuos e independientes. Se puede suponer un potencial armónico para describir el estiramiento de los enlaces  $Ec.$  [2.2] y la variación de los ángulos  $Ec.$  [2.3].

$$V_{\text{estiramiento}} = \frac{1}{2} \sum_i k_{s,i} (r_i - r_{i,0})^2, \quad (2.2)$$

donde  $k_{s,i}$ , es la fuerza constante para el enlace  $i$ , este parámetro controla la rigidez del resorte enlazado,  $r_{i,0}$  define la longitud de equilibrio y  $r_i$  representa el desplazamiento de la posición de equilibrio. Únicamente los parámetros  $k_{s,i}$  y  $r_{i,0}$  son designados para cada par de átomos enlazados basándose en su tipo (por ejemplo, C-C, O-H, C-H, etc.). Esta ecuación estima la energía asociada con la vibración alrededor de una longitud de enlace de equilibrio.

$$V_{\text{curvatura}} = \frac{1}{2} \sum_i k_{v,i} (v_i - v_{i,0})^2, \quad (2.3)$$

donde  $k_{v,i}$  es la fuerza constante para el ángulo de curvatura  $i$ ,  $v_{i,0}$  define el ángulo de equilibrio y  $v_i$  representa el desplazamiento de la posición de equilibrio. Solamente los parámetros  $k_{v,i}$  y  $v_{i,0}$  son asignados para cada tercia de átomos enlazados basándose en su tipo (por ejemplo, C-C-C, C-O-C, C-C-H, etc.). Esta ecuación estima la energía asociada con la vibración alrededor del ángulo de enlace de equilibrio.

### 2.3. Potencial para los ángulos de torsión.

La forma general del potencial de torsión para rotaciones alrededor de enlaces se escribe como una función periódica *Ec.* [2.4], como puede verse en la *figura* 2.2. La energía de torsión puede pensarse como el resultado de una repulsión entre los enlaces no cubiertos por las interacciones de van der Waals.

$$V_{\text{torsión}} = \sum_{n,j} \frac{V_{n,j}}{2} (1 + \cos(n\varphi_j)), \quad (2.4)$$

donde  $\varphi$  es el ángulo de torsión,  $V_{n,j}$  es un parámetro que controla la amplitud de la curva y  $n$  controla su periodicidad. Únicamente para cada cuarteto de átomos enlazados se asigna los parámetros de torsión basándose en sus tipos (por ejemplo C-C-C-C, C-O-C-N, H-C-H-C, etc.).

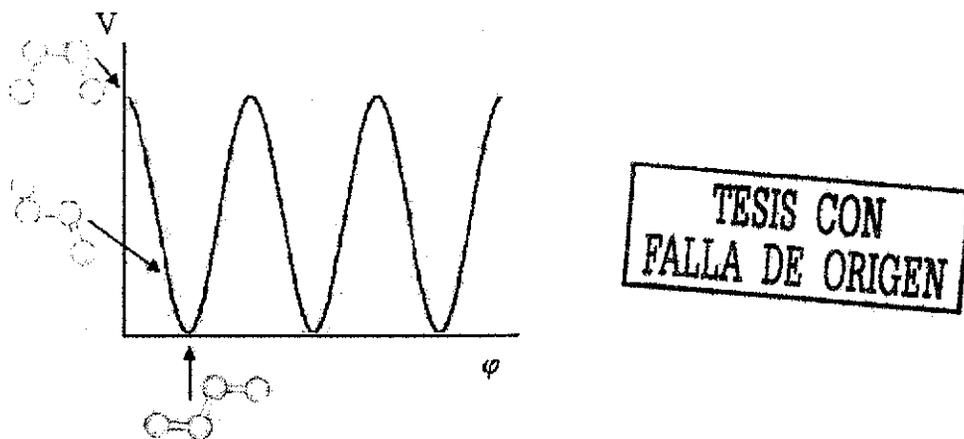


Figura 2.2 Diagrama que representa la periodicidad del potencial de torsión.

### 2.4. Potenciales para las interacciones de van der Waals, del enlace de hidrógeno y electrostáticas.

Las interacciones entre átomos que no están enlazados unos con otros a un átomo común generalmente son referidas como interacciones de van der Waals. El potencial de van der Waals es una interacción electrostática que se compone de dos partes. La primera es una parte repulsiva que actúa a distancias cortas y la segunda es una parte atractiva que actúa a distancias largas.

Las fuerzas repulsivas se originan cuando las nubes de electrones de dos moléculas se aproximan lo suficientemente cerca que se superponen, el principio de superposición de Pauli prohíbe a algunos electrones ocupar la región superpuesta y así, se reduce la densidad electrónica en la región. Entonces, los núcleos de ambas moléculas cargados positivamente ejercerán una fuerza repulsiva. La repulsión

ocurre cuando las distancias entre los átomos que interactúan llegan a ser más pequeñas que la suma de sus radios en contacto y se representa por  $r^{-12}$ .

Las fuerzas atractivas se originan cuando la superposición de las nubes electrónicas es pequeña y son proporcionales  $r^{-6}$ . Hay tres posibles contribuciones, las cuales dependen de la naturaleza de las moléculas que interactúan y son las siguientes:

(a) Contribución electrostática. Esta contribución se debe a la interacción de moléculas que poseen momentos dipolares y dependen fuertemente de su relativa orientación. Algunas moléculas no dipolares poseen un momento cuadrupolar, el cual contribuye al potencial electrostático de manera similar.

(b) Contribución inducida. Se presenta cuando interactúan moléculas con momentos dipolares permanentes con moléculas no polares. El campo eléctrico de la molécula polar distorsiona la distribución de la carga electrónica de la molécula no polar, produciendo un momento dipolar inducido. Este dipolo inducido interactúa con el dipolo produciendo una fuerza atractiva.

(c) Contribución de dispersión. Representa la interacción de las capas electrónicas de los átomos y moléculas con valencias saturadas. No depende de la existencia de cargas, de los momentos dipolares, momentos cuadrupolares, etc. Esta contribución tiene su origen en la representación de los electrones en una molécula como osciladores armónicos. En un instante la molécula posee un dipolo eléctrico instantáneo, el cual induce un dipolo instantáneo en una segunda molécula, produciendo una atracción.

Así, la forma más general del potencial para las interacciones de van der Waals se representa por el potencial de Lennard - Jones 6-12 (figura 2.3) y es la suma de las fuerzas repulsivas y atractivas, Ec. [2.5].

$$V_{vdW} = \sum_{i < j} \left[ \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right] \quad (2.5)$$

El parámetro  $A_{ij}$  determina el grado de dureza de los átomos, el parámetro  $B_{ij}$  determina el grado de adhesividad de la atracción de van der Waals y  $r_{ij}$  es la distancia interatómica.

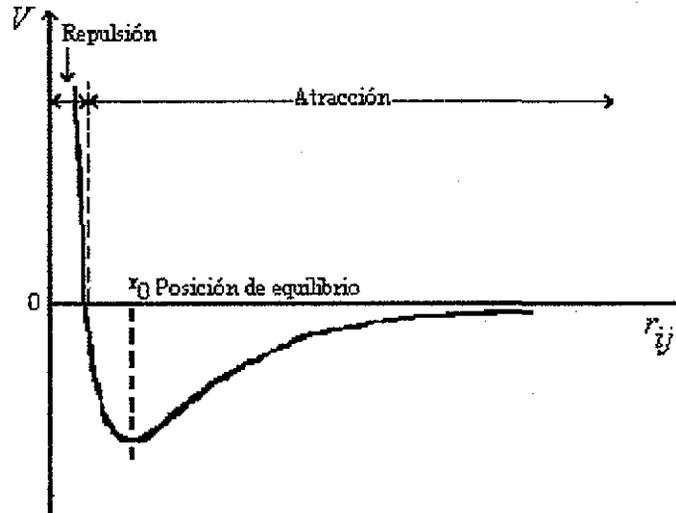
Para la energía de interacción entre átomos capaces de formar enlaces de hidrógeno, el potencial de Lennard - Jones 6-12, es reemplazado por 10-12 [40]:

$$V_{eH} = \sum_{i < j} \left[ \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right] \quad (2.6)$$

Finalmente, el término electrostático se representa principalmente por la ley de Coulomb y el potencial tiene la forma:

$$V_{\text{electrostático}} = \sum_{i < j} \frac{e_i e_j}{\epsilon r_{ij}}, \quad (2.7)$$

donde  $r_{ij}$  es la distancia interatómica,  $e_i$ ,  $e_j$  son las cargas de los átomos y  $\epsilon$  es la constante dieléctrica. [41]



**Figura 2.3** Diagrama que representa el potencial Lenard-Jones 6-12. A distancias cortas el potencial está representado por  $r^{-12}$  y es repulsivo, mientras que para distancias grandes es atractivo y es proporcional a  $r^{-6}$ .

## 2.5. Parametrización

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El conjunto de funciones de potencial de la Ec. [2.1] contiene parámetros que se obtienen a partir de datos experimentales y de estudios de pequeñas moléculas que son químicamente similares a segmentos de la molécula de interés. Las propiedades moleculares utilizadas para calcular los parámetros del campo de fuerza incluyen, por ejemplo, estructuras moleculares, energías de conformación, frecuencias vibracionales, barreras de rotación interna, momentos dipolares, e interacciones intermoleculares. Para obtener buenos resultados, los parámetros deberán ser cuidadosamente derivados y seleccionados. Los parámetros son usualmente redefinidos para dar resultados correctos en cálculos sobre sistemas experimentales bien caracterizados antes de ser aplicados a nuevos sistemas.

El procedimiento general para encontrar los valores de los parámetros en un campo de fuerzas es utilizar información experimental o información teórica de cálculos con mecánica cuántica, ab initio. Algunos de los métodos experimentales son: espectroscopía vibracional, difracción de rayos X,

resonancia magnética nuclear (RMN), difracción de electrones, espectroscopía de microondas, entre otros [2, 38].

El ajuste de los parámetros se realiza tomando en cuenta que cada átomo de una molécula pertenece a algunos de los *tipos de átomos posibles* [42, 43], lo cual depende del número atómico y del entorno molecular. Por ejemplo, algunos tipos de átomos comúnmente utilizados en campos de fuerzas para compuestos orgánicos son carbonos  $sp^3$  (saturados), carbonos  $sp^2$  (enlace doble), carbonos  $sp$  (enlace triple), carbonos del grupo carbonil  $C = O$ , carbonos aromáticos (por ejemplo, átomos de carbono que pertenecen a anillos de carbono y el carbono C5 de la timina [43]), carbonos unidos a H, hidrógenos unidos a O, hidrógenos unidos a N, etc. Así, los campos de fuerzas contendrá sus tipos de átomos, los cuales dependerán de las decisiones de sus constructores.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# Capítulo 3

## Programa CONAN

El programa CONAN (CONformational ANalysis of nucleic acids) [24], fue diseñado para el análisis de fragmentos de ADN que contienen algunos nucleótidos con bases naturales y modificadas. Permite modelar tanto fragmentos regulares con diferentes tipos de simetría, como fragmentos irregulares que incluyen curvatura, pares de bases incorrectas y lesionadas. Los cálculos y la minimización de la energía se desarrollan en el espacio de variables estructurales internas las cuales determinan el arreglo mutuo base-base, azúcar-base, así como el plegamiento de la unidad de azúcar. El procedimiento analítico es aplicado a las unidades de azúcar y a los fragmentos de la columna entre unidades de azúcares adyacentes. Esto da un rango suficientemente largo para la variación de los ángulos de torsión de la cadena, debido a los tipos diferentes de arreglos mutuos entre las bases sucesivas. Para una energía de minimización más efectiva, es calculado el gradiente analíticamente. Las conformaciones de mínima energía obtenidas con el programa CONAN pueden ser comparadas con datos de difracción de rayos X para cristales y fibras, y con datos RMN para soluciones.

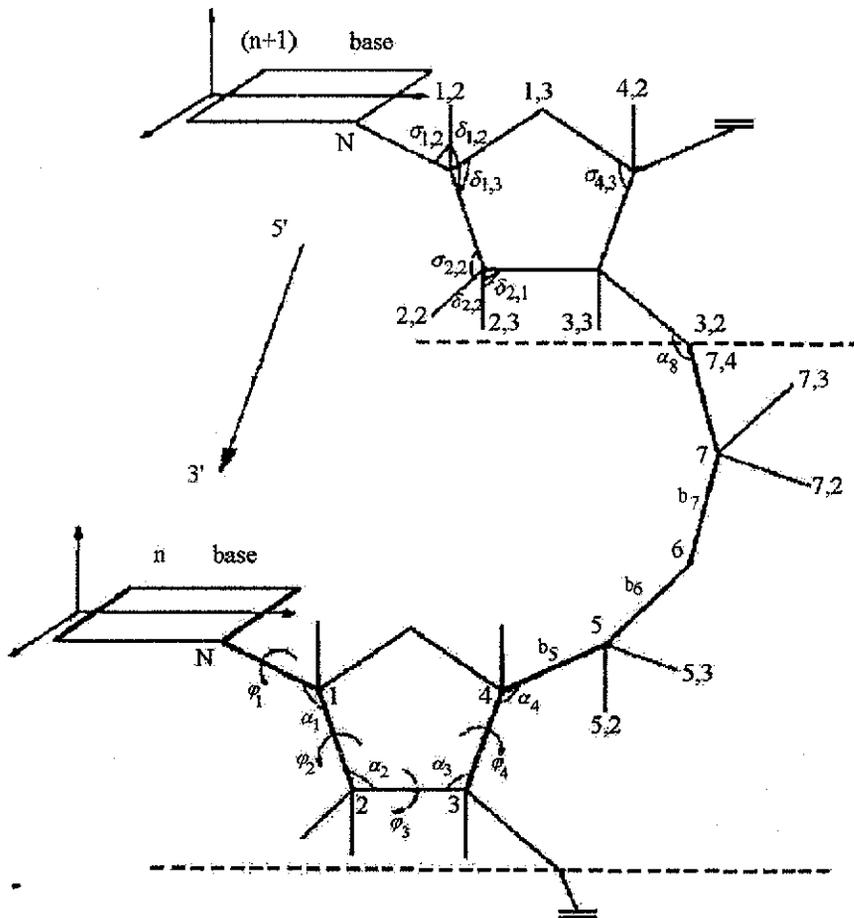
Como variables estructurales internas se escogen parámetros definidos con respecto al eje de la hélice, tales como torcedura ( $\Omega$ ), cambio ( $Dz$ ), propulsor ( $\pi$ ), inclinación ( $\tau$ ), giro ( $p$ ), (ver fig.1.8) etc. También se incluyen las variables de la unidad de azúcar y los ángulos de torsión glicosídicos. Se introduce un conjunto de parámetros para cada base el cual describe las desviaciones de la geometría de los pares de bases de Watson-Crick (fig.1.4) tales como rizo ( $\kappa$ ), propulsor ( $\pi$ ), abertura ( $\sigma$ ), deslizamiento, alargamiento y escalonamiento, (ver fig.1.8). El conjunto de parámetros que utiliza el programa CONAN es más grande que el conjunto mínimo, pero da la oportunidad de definir estructuras regulares e irregulares con características predefinidas al escoger las variables. Por lo que resulta fácil la construcción de conformaciones inusuales a partir de estructuras regulares u otras conocidas y el análisis de los resultados se hace en términos de las desviaciones de estas estructuras regulares.

### 3.1. Método

Se considera una doble hélice de un fragmento de ADN que consiste de  $N_p$  pares de nucleótidos o  $N_c=2N_p$  nucleósidos. Los nucleótidos son numerados empezando por el extremo 3'-final de una de las hélices. Una hélice de ADN consiste de unidades estructurales. Una unidad estructural (se muestra en la fig.3.1) incluye una base, una unidad de azúcar desoxirribosa y un fragmento de columna que

conecta a dos unidades desoxirribosas.

La estructura tridimensional de un fragmento de ADN se define por constantes y variables de conformación [24]. Los *enlaces* y los *ángulos* se consideran constantes, excepto los ángulos internos de la unidad de azúcar y el ángulo que forman los átomos P-O3'-C3' ( $\alpha_8$ ). La estructura interna de las *bases* se considera rígida (sus *ángulos* y *enlaces* son constantes) y plana [24, 44] (excepto los hidrógenos de los grupos metil (CH<sub>3</sub>) de la timina y de las bases modificadas).



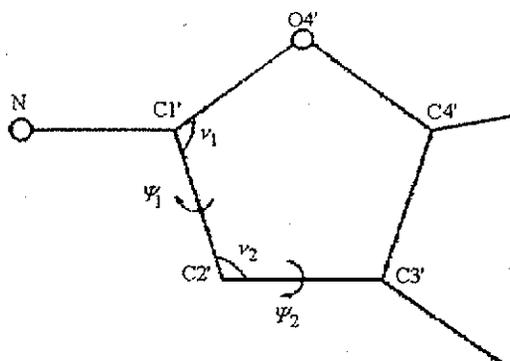
**Figura 3.1** Unidad estructural n (separada por líneas punteadas) incluye la base n (un rectángulo, N denota purina N9 o pirimidina N1) y la "cadena principal" C1', C2', C3', C4', C5', O5' y P, se escribe como 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, respectivamente. Los átomos laterales tienen dobles índices; para  $N_i$ , los átomos laterales de la cadena de a lado, conectada a la principal i, los índices son (i,2), (i,3)...(i,  $N_i$ ). Así el átomo O3' tiene el índice (3,2) cuando este pertenece a la (n+1)-ésima unidad estructural y el índice (7,4) cuando pertenece a la n-ésima. Los ángulos de enlace dentro de la unidad desoxirribosa  $\delta_{1,3}$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_{4,3}$ , tienen valores variables. Los ángulos de enlace ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$ ,  $\alpha_7$ ) y los ángulos de enlace de los átomos de a lado son constantes.  $\varphi_1$  es el ángulo de torsión glicosídico,  $\varphi_2$  y  $\varphi_4$  son calculados por los ángulos de torsión del azúcar.

Para poder modelar cualquier curso del eje de un fragmento de ADN, incluyendo diferentes tipos de curvaturas y enroscamientos de segmentos de ADN de familias diversas, el programa CONAN define el siguiente subconjunto de variables

1. Variables de los plegamientos de la desoxirribosa  $S = \{S_n, n = 1, \dots, N_c\}$ .
2. Ángulos de torsión glicosídicos  $X = \{\chi_n, n = 1, \dots, N_c\}$ .
3. Torsión de los grupos metil  $CH_3$  (para bases con grupos metil).
4. Variables que definen la posición de las bases en un par  $K = \{K_n, n = 1, \dots, N_c\}$ .
5. Variables que caracterizan la posición de un par bases relativa al eje de la hélice,  $H = \{H_n, n = 1, \dots, N_p\}$ .
6. Variables que describen la posición mutua de pares de bases adyacentes,  $B = \{B_n, n = 1, \dots, N_p - 1\}$ .

### 3.1.1 Variables del plegamiento de la desoxirribosa.

Dos métodos para la descripción de la conformación de la unidad de azúcar son posibles en CONAN. El primer método esta basado en el algoritmo para el cálculo analítico de la geometría de un ciclo cerrado  $N$  con las longitudes de enlace fijas como se describen en [45, 46]. Un conjunto de cuatro variables independientes, dos ángulos de enlace y dos ángulos de torsión, escogidos como se muestran en la *figura 3.2*,  $S = \{v_{1n}, v_{2n}, \Psi_{1n}, \Psi_{2n}\}$ , definen completamente a la desoxirribosa [24]. En cuanto al segundo método, cinco ángulos de enlace y cinco ángulos de torsión pueden calcularse via fase y amplitudes de pseudorrotación,  $S = \{P_n, A\}$ , como en [34]. Los ángulos calculados de esta manera no dan una unidad de azúcar completamente cerrada. El programa CONAN utiliza este metodo para obtener los valores de las cuatro variables para el primer método.



**Figura 3.2** Variables independientes de la conformación del azúcar. Angulos de enlace  $\nu_1$ ,  $\nu_2$ , y ángulos de torsión  $\Psi_1$ ,  $\Psi_2$ .

### 3.1.2 Cálculo de la energía potencial de un fragmento de ADN.

La energía total  $E$  de una conformación de fragmento de ADN es calculada por la suma de funciones de potenciales semi-empíricos especialmente ajustados a los ácidos nucleicos [43, 47] y términos adicionales  $E_{add}$ .

$$\begin{aligned}
 E = & \sum_{i < j} \frac{332e_i e_j}{\epsilon r_{ij}} + \sum_{i < j} \left[ \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right] + \sum_{n,j} \frac{V_{n,j}}{2} (1 + \cos(n\varphi_j)) + & (3.1) \\
 & \sum_{n,j} \frac{V_{n,j}}{2} (1 + \cos(n\psi_j)) + \sum_i k_\nu (\nu_i - \nu_{i,0})^2 \\
 & + k_\alpha (\alpha_8 - \alpha_8^0)^2 + E_{add}
 \end{aligned}$$

El primer término es la suma de interacciones electrostáticas entre cargas  $e_i$ ,  $e_j$ , de átomos  $i$ ,  $j$ , separados una distancia  $r_{ij}$ , el factor numérico es elegido de tal forma que la energía tenga unidades de kilocalorías/mol cuando las distancias son expresadas en Å y las cargas en unidades de la carga fundamental. El segundo término es el potencial de Lennard-Jones 6-12, el cual es reemplazado por 10-12 para pares de átomos capaces de formar enlaces de hidrógeno [47]. Ambos potenciales dependen sólo de la magnitud de las distancias de separación de los átomos y representan las interacciones entre pares de átomos. Los términos tercero y cuarto de la Ec.[3.1] son el potencial de rotación interna de la columna y de los ángulos de torsión de la unidad de azúcar, respectivamente. El quinto término es el potencial para los ángulos de enlace de la unidad de azúcar. El término  $k_\alpha (\alpha_8 - \alpha_8^0)^2$  es la consecuencia de las desviaciones del ángulo de enlace  $\alpha_8$  (ver fig.3.1) desde su valor promedio en

cristales  $\alpha_8^0=121.8^\circ$ . Como regla se consideran interacciones entre nucleótidos cercanos, pero en casos especiales interacciones entre nucleótidos más distantes pueden ser también consideradas dentro de los cálculos.

Términos adicionales: El número de términos adicionales y su composición dependen del modelo utilizado y del problema estudiado, por ejemplo, son restricciones entre las distancias interatómicas, interprotónicas o entre la distancia entre los planos de bases adyacentes  $H$ , etc [24].

Para ácidos nucleicos, los parámetros que utiliza el programa CONAN en la *Ec.*[3.1] se calcularon estudiando una gran variedad de sistemas, empezando con fragmentos químicos básicos como hidrocarburos, polipéptidos, y sus análogos de bajo peso molecular. Después se extienden los cálculos a una gran variedad sistemas de ácidos nucleicos, empezando con unidades de nucleótidos, anillos de furanosas, pares de bases, cadenas azúcar fosfato, etc.[43, 48, 49]

# Capítulo 4

## Resonancia Magnética Nuclear

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (*RMN*) es una de las herramientas más poderosas para elucidar la estructura molecular. La *RMN* se basa en la medición de la absorción de la radiación electromagnética en la región de radio frecuencia de 4 a 600 MHz. En contraste con otros tipos de espectroscopía en *RMN* se observa el proceso de absorción por parte de núcleos atómicos. La información que se obtiene acerca de los núcleos se utiliza para deducir su ambiente químico. En regla para que los núcleos desarrollen los estados de energía requeridos para que el proceso de absorción ocurra, es necesario colocar la muestra a estudiar en un campo magnético intenso. Para explicar la *RMN* consideremos un núcleo con espín  $I$  y momento angular  $\vec{p}$ . Sabemos que el momento angular  $\vec{p}$  está cuantizado en múltiplos de  $h/2\pi$ , donde  $h$  es la constante de Planck. También sabemos que el núcleo tendrá  $(2I + 1)$  estados y que la componente del momento angular (por ejemplo  $p_z$ ) de estos estados en cualquier dirección tendrá valores de  $I, I - 1, \dots, -I$ . En ausencia de un campo magnético externo, los estados tendrán energías idénticas.

Consideremos el momento magnético nuclear  $\vec{\mu}$  de un núcleo, en particular, la componente en el eje  $z$  es

$$\mu_z = \gamma \hbar m_I, \quad (4.1)$$

donde  $\gamma$  es la constante de proporcionalidad denominada radio giromagnético y tiene diferentes valores para cada núcleo.  $\hbar m_I$  es la componente  $z$  del momento angular  $\vec{p}$ . Cada valor de  $m_I$  corresponde a diferentes orientaciones del espín nuclear y por lo tanto del momento magnético nuclear. En un campo magnético  $\vec{B}$ , los  $2I + 1$  estados cuánticos del núcleo tienen diferentes energías, las cuales están dadas por

$$E_{m_I} = -\mu_z B = -\gamma \hbar B m_I. \quad (4.2)$$

Las energías son expresadas en términos de la frecuencia de Larmor  $\nu_L$ , como

$$E_{m_I} = m_I \hbar \nu_L, \quad (4.3)$$

donde

$$\nu_L = \frac{\gamma B}{2\pi}. \quad (4.4)$$

Los cuatro núcleos que han sido de gran interés para la química orgánica y la bioquímica tienen espín  $I = 1/2$  e incluyen  $^1H$ ,  $^{13}C$ ,  $^{19}F$  y  $^{31}P$ . Para estos núcleos, existen dos estados que corresponden a  $m = 1/2$  y  $m = -1/2$ . La separación de energía entre los estados posibles es entonces

$$\Delta E = E_\beta - E_\alpha = \frac{1}{2}\gamma\hbar B - \left(\frac{1}{2}\gamma\hbar B\right) = \gamma\hbar B. \quad (4.5)$$

Cuando un núcleo está en un campo magnético, la población inicial de sus estados de energía está determinada por la distribución de Boltzmann<sup>1</sup>. Esto es muy importante y significa que el estado menos energético  $\alpha(m = 1/2)$  tiene ligeramente más núcleos que el estado  $\beta(m = -1/2)$ . Si el sistema se irradia con radiación de frecuencia  $\nu$ , los núcleos entrarán en resonancia si la frecuencia  $\nu$  satisface

$$h\nu = \hbar B = h\nu_L. \quad (4.6)$$

Esto es, hay resonancia cuando  $\nu = \nu_L$  y la radiación tiene la frecuencia de Larmor. En resonancia hay un fuerte acoplamiento entre espines nucleares y la radiación; y una fuerte absorción ocurre cuando un espín hace la transición  $\alpha \rightarrow \beta$ .

La interacción de la señal de radio frecuencia (*rf*) con los núcleos no es directa debido a que la frecuencia de radiación de un núcleo es fuertemente afectada por su ambiente químico, esto es, por electrones y núcleos vecinos. El momento magnético nuclear  $\vec{\mu}$  interactúa con un campo magnético *local*. Este campo *local* difiere del campo magnético aplicado debido a que este último induce un momento angular orbital electrónico, el cual da lugar a un pequeño campo magnético  $\delta B$  en el núcleo. El campo  $\delta B$  es generalmente opuesto y proporcional al campo aplicado, esto es

$$\delta B = -\sigma B, \quad (4.7)$$

---

<sup>1</sup>Distribución de Boltzmann

$\frac{N_i}{N_0} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right)$ ,  $N_j$  es el número de núcleos en el estado  $\beta$ ,  $N_0$  es el número de núcleos en el estado  $\alpha$ ,  $T$  es la temperatura,  $k = 1.38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$  es la constante de Boltzmann y  $\Delta E = \gamma\hbar B$ .

donde  $\sigma$  se denomina *constante de apantallamiento*, la cual es determinada por la densidad electrónica y la distribución alrededor de los núcleos. De esta forma, el campo magnético *local* es

$$B_{loc} = B + \delta B = (1 - \sigma)B, \quad (4.8)$$

y la frecuencia de Larmor

$$\nu_L = \frac{\gamma B_{loc}}{2\pi} = (1 - \sigma) \frac{\gamma B}{2\pi}. \quad (4.9)$$

Esta frecuencia es diferente incluso para núcleos iguales en diferentes ambientes. Aún cuando las frecuencias se pueden reportar en términos de  $\sigma$ , es conveniente utilizar una cantidad empírica denominada *cambio químico*, la cual se define como la diferencia entre la frecuencia de resonancia del núcleo en cuestión y uno de referencia. Por ejemplo, para el isótopo  $^1H$  con un protón, la referencia es  $Si(CH_3)_4$ . El cambio químico se emplea para la identificación de grupos funcionales y ayuda a determinar su arreglo estructural. Los cambios químicos son reportados en la escala  $\delta$ , la cual expresa el cambio relativo en partes por millón y se define como

$$\delta = \frac{\nu_L - \nu_0}{\nu_0} \times 10^6, \quad (4.10)$$

donde  $\nu_0$  es la frecuencia de resonancia de referencia. El valor de  $\delta$  es un indicativo del apantallamiento de un núcleo relativo al núcleo de referencia.  $\delta > 0$  indica que el campo  $\delta B$  es más fuerte que el campo que experimenta el núcleo de referencia en las mismas condiciones. Para  $^1H$  el rango del cambio químico es de 15 a 0 ppm.

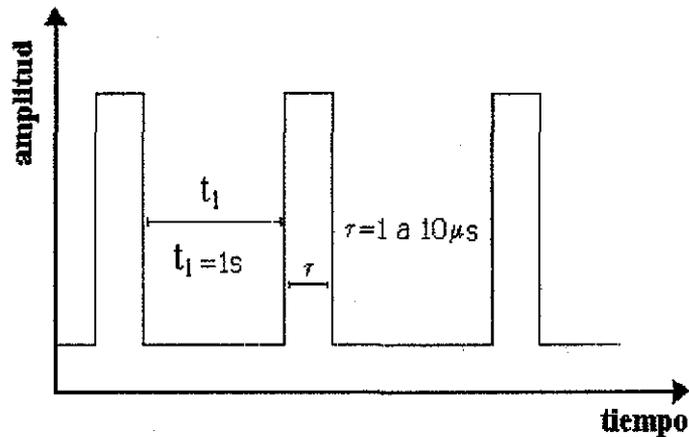
En la actualidad, las técnicas de *RMN* son más sofisticadas que buscar simplemente la frecuencia a la cual ocurre la resonancia. En los experimentos, núcleos en un fuerte campo magnético son irradiados periódicamente con pulsos breves de rf intensos, ver *figura 4.1*. La longitud de los pulsos es  $\tau$  y es usualmente menor que  $10\mu s$ , el intervalo  $t_1$  entre pulsos es de uno a varios segundos. Durante el tiempo  $t_1$ , una señal de rf dependiente del tiempo  $S(t)$ , llamada señal de decaimiento de inducción libre (*FID*) es emitida conforme los núcleos retornan a su estado original. Esta señal es entonces convertida a una señal en el dominio de frecuencias al aplicar la transformada de Fourier a  $S(t)$ , así se obtiene que

$$I(\nu) = 2 \operatorname{Re} \int_0^\infty S(t) e^{2\pi i \nu t} dt, \quad (4.11)$$

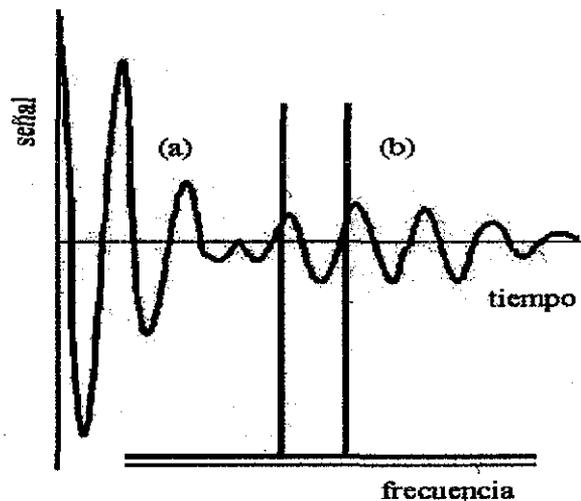
donde  $I(\nu)$  es la intensidad y  $e^{2\pi i\nu t}$  es la señal con frecuencia  $\nu$ .

Cuando la señal en la *figura 4.2(a)* es transformada de esta forma (Ec.[4.11]), se obtiene un espectro en el dominio de las frecuencias como se muestra en la *figura 4.2(b)*.

Cada línea representa la frecuencia de Larmor de cada uno de los núcleos involucrados.



**Figura 4.1** Perfil de un pulso de rf en las técnicas modernas de RMN.  $T$  es el intervalo entre pulsos y  $\tau$  es la longitud de un pulso.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Figura 4.2** (a) Ejemplo de una señal de FID y (b) su análisis en sus componentes de frecuencia.

## 4.1. Procesos de relajación en RMN

En principio, cuando un núcleo es expuesto a radiación de una frecuencia dada, la absorción ocurre debido al ligero exceso de núcleos en el estado de baja energía. Puesto que este exceso es pequeño, siempre existe el peligro de que después del proceso de absorción se iguale el número de núcleos en

ambos estados cuánticos, en cuyo caso, la señal  $S(t)$  decaerá y se aproximará a cero. Cuando esto ocurre, se dice que el sistema está *saturado*. En regla para reducir la saturación y producir señales de absorción fácilmente detectables, la relajación debe ocurrir tan rápido como sea posible, esto es, el tiempo de vida de los núcleos en estado excitado debe ser pequeño. Existen dos procesos de relajación principales, el primero se denomina *relajación espín-red* y el segundo *relajación espín-espín*.

*Relajación espín-red.* Los núcleos que absorben la radiación en un experimento de *RMN* son parte de un ensamblaje de átomos que constituyen la muestra. Este ensamblaje es denominado *red*. En líquidos y gases sobre todo, los núcleos que forman la red se encuentran en movimiento rotacional y vibracional, lo cual crea un campo magnético complejo alrededor de ellos. Este campo contiene un continuo de componentes magnéticas, algunas de estas componentes serán iguales a la frecuencia de Larmor  $\nu_L$  de los núcleos de interés. La interacción con las componentes magnéticas lleva a los núcleos de un estado de espín alto a un espín bajo. La energía absorbida por la red simplemente incrementa la amplitud de las rotaciones y vibraciones, lo cual corresponde a un mínimo aumento de la temperatura de la red. La relajación espín-red es un proceso que puede ser caracterizado por un tiempo de relajación  $T_1$ , el cual es una medida del tiempo promedio de vida de los núcleos en el estado de alta energía.

*Relajación espín-espín.* Este proceso tiene lugar debido a la interacción entre núcleos vecinos que tienen frecuencias de resonancia idénticas pero se encuentran en estados cuánticos distintos. Este tipo de interacción corresponde a un intercambio de los estados cuánticos entre dos núcleos que se hayan en estados distintos; un núcleo en el estado de baja energía será excitado, mientras que el núcleo excitado se relaja al estado de baja energía. No hay un cambio neto en la población de los estados, pero en promedio el tiempo de vida de un núcleo en un estado excitado decrecerá. Este efecto es normalmente descrito por un tiempo de relajación  $T_2$ .

## 4.2. Efecto Nuclear Overhauser

El efecto Nuclear Overhauser es un cambio en la intensidad de la radiación de radio frecuencia (*rf*) absorbida por un espín cuando otro espín vecino está saturado. Los espines que interfieren pueden ser diferentes.

Recordemos que un núcleo con espín  $1/2$  en un campo magnético  $B$  tendrá dos niveles de energía, que difieren en energía por

$$\Delta E = \gamma \hbar B. \quad (4.5)$$

Si un campo de *rf* con frecuencia igual a la frecuencia de Larmor  $\nu_L$  de los espines nucleares es aplicado, ciertas transiciones serán inducidas entre estos niveles de energía. El número de transiciones

$\alpha \rightarrow \beta$  causadas por la señal de rf será proporcional a  $P_\alpha$ , la población del estado  $\alpha$ ; el número de transiciones  $\beta \rightarrow \alpha$  será similarmente proporcional a  $P_\beta$ . Así, la intensidad neta de la absorción será proporcional a  $P_\beta - P_\alpha$ . Si la señal de rf irradiada es muy fuerte se producirá saturación  $P_\alpha \simeq P_\beta$  y la intensidad de la absorción neta será nula.

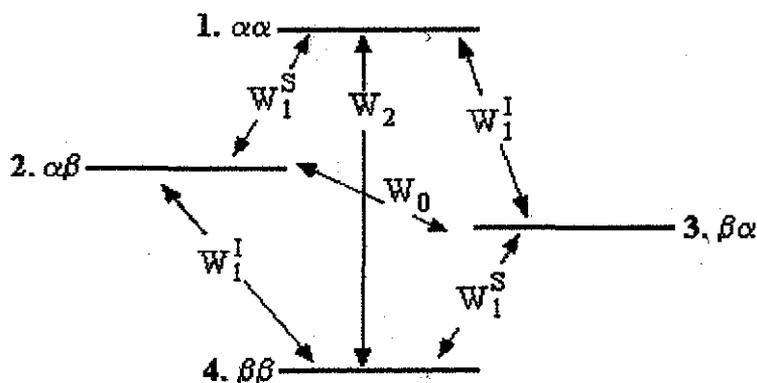
El principal mecanismo del retorno de los núcleos al equilibrio será la *relajación espín-red*. (descrita en la sección anterior). Denotemos por  $W_{\alpha\beta}$  la probabilidad por unidad de tiempo de que una transición ocurra entre los estados  $\alpha$  y  $\beta$  debido a la *relajación espín-red*. Consideremos ahora un sistema de dos núcleos con espín 1/2 suponiendo inicialmente que son de la misma especie, químicamente combinados, pero no acoplados. Denominemos a estos espines  $I$  y  $S$ . Así, los niveles de energía serán

Tabla 4.1

*Estados de energía del sistema de espines  $S$  y  $I$ .*

Nivel	Estado de espín $S$	Estado de espín $I$	Estado del sistema
1	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha\alpha$
2	$\alpha$	$\beta$	$\alpha\beta$
3	$\beta$	$\alpha$	$\beta\alpha$
4	$\beta$	$\beta$	$\beta\beta$

Estos niveles de energía y las transiciones posibles son mostradas en la *figura 4.3*.



**Figura 4.3** Diagrama de los niveles de energía para un sistema de dos espines. Las  $W$  representan las probabilidades de transición debidas a la relajación espín-red. El estado del espín  $S$  se menciona primero; por ejemplo,  $\alpha\beta$  significa que  $S$  es  $\alpha$  e  $I$  es  $\beta$ .

La descripción de la *relajación espín-red* requiere de cuatro probabilidades de transición  $W_1^I$ ,  $W_1^S$ ,  $W_2$  y  $W_0$ . Las probabilidades de transición se pueden definir de la siguiente manera.

$W_1^I$ : La probabilidad de transición única del espín  $I$  del estado  $\alpha \rightarrow \beta$  (y  $\beta \rightarrow \alpha$ ) mientras el espín

$S$  permanece sin cambio.

$W_1^S$ : La probabilidad de transición única del espín  $S$  del estado  $\alpha \rightarrow \beta$  (y  $\beta \rightarrow \alpha$ ) mientras el espín  $I$  permanece sin cambio.

$W_2$ : Representa las probabilidades de transición de los dos espines  $I$  y  $S$ , cuando se relajan simultáneamente en la misma dirección.

$W_0$ : Es la probabilidad de transición nula que se da cuando los espines sólo intercambian sus espines, esto es,  $\alpha\beta \rightarrow \beta\alpha$  o  $\beta\alpha \rightarrow \alpha\beta$ .

Denotemos las poblaciones de equilibrio por  $P^0$ . Así, para los niveles 2 y 3 las poblaciones correspondientes  $P_2^0$  y  $P_3^0$  serán casi iguales ya que los niveles de energía son similares, denotemos por  $\Pi$  tales poblaciones. La población del nivel 1, el más energético, será menor por una cantidad  $\delta'$ , mientras que el nivel 4, el menos energético, será mayor por la misma cantidad  $\delta'$ . Las poblaciones de equilibrio se muestran en la *tabla 4.2*.

La resonancia del espín  $S$  consistirá de dos transiciones, 1-2 y 3-4, del mismo modo, la resonancia del espín  $I$  tendrá dos componentes, 1-3 y 2-4. La intensidad de la absorción del espín  $I$ , será proporcional a

$$(P_3 - P_1) + (P_4 - P_2), \quad (4.12)$$

cuyo valor de equilibrio es igual a  $2\delta'$  (ver *tabla 4.2* y *4.3*). Si una fuerte señal de rf es aplicada a  $S$  con su frecuencia de resonancia, este espín será saturado con el resultado

$$P_1 = P_2 \text{ y } P_3 = P_4. \quad (4.13)$$

Puesto que el número total de espines

$$P_1 + P_2 + P_3 + P_4 = 4\Pi, \quad (4.14)$$

permanece constante, puede demostrarse fácilmente cuales son las poblaciones de los niveles resultantes de la saturación del espín  $S$ , las cuales se muestran en la tercera columna de la *tabla 4.2*. Estos cambios de población, sin embargo, no dan como resultado ningún cambio en la intensidad de la absorción del espín  $I$  (ver *tabla 4.3*).

**Tabla 4.2**

Poblaciones de los niveles de energía del sistema de los espines en equilibrio, con espín  $S$  saturado y bajo los efectos de las transiciones  $W_2$  y  $W_0$  por separado. Aquí, *sc* significa sin cambio.

Nivel	Poblaciones de equilibrio	espín $S$ saturado	Efecto de $W_2$	Efecto de $W_0$ solamente
1. $\alpha\alpha$	$P_1^0 = \Pi - \delta'$	$\Pi - \frac{1}{2}\delta'$	$\Pi - \frac{1}{2}\delta' - d$	sc
2. $\alpha\beta$	$P_2^0 = \Pi$	$\Pi - \frac{1}{2}\delta'$	sc	$\Pi - \frac{1}{2}\delta' + d$
3. $\beta\alpha$	$P_3^0 = \Pi$	$\Pi + \frac{1}{2}\delta'$	sc	$\Pi - \frac{1}{2}\delta' - d$
4. $\beta\beta$	$P_4^0 = \Pi + \delta'$	$\Pi + \frac{1}{2}\delta'$	$\Pi + \frac{1}{2}\delta' + d$	sc

**Tabla 4.3**

Intensidad de la absorción por el espín  $I$  cuando el espín  $S$  es saturado y se llevan a cabo diferentes transiciones,  $W_1^I$ ,  $W_1^S$ ,  $W_2$  y  $W_0$ , cada una por separado.

	$P_3 - P_1$	$P_4 - P_2$	Intensidad de la absorción de $I$
Equilibrio	$\delta'$	$\delta'$	$2\delta'$
$S$ saturado	$\delta'$	$\delta'$	$2\delta'$
$W_1^I$	$\delta'$	$\delta'$	$2\delta'$
$W_1^S$	$\delta'$	$\delta'$	$2\delta'$
$W_2$	$\delta' + d$	$\delta' + d$	$2\delta' + 2d$
$W_0$	$\delta' - d$	$\delta' - d$	$2\delta' - 2d$

Consideremos ahora el efecto de la saturación de  $S$  en la probabilidades. Como puede verse en la figura 4.3,  $W_1^I$  causa relajación entre 1-3 y 2-4, no obstante, como la saturación de  $S$  ha dejado estos niveles en equilibrio entre si, esto es

$$P_3 - P_1 = P_3^0 - P_1^0 = \delta', \quad (4.15)$$

$$P_4 - P_2 = P_4^0 - P_2^0 = \delta',$$

no habrá cambio en la intensidad de  $I$  por efecto de  $W_1^I$  (ver tabla 4.3). Además, debido a la saturación  $W_1^S$  no podrá causar transiciones 1→2 ó 3→4. Observemos a continuación que pasa con las transiciones  $W_2$  y  $W_0$ .

En el caso de  $W_2$ , la diferencia de poblaciones  $P_4 - P_1 = \delta'$  será menor que el valor de equilibrio

$P_4^0 - P_1^0 = 2\delta'$ . Por tanto, para restablecer el equilibrio el efecto de  $W_2$  será incrementar  $P_4$  y disminuir  $P_1$ . Denominemos  $d$  a la cantidad de población transferida de 1 a 4, entonces

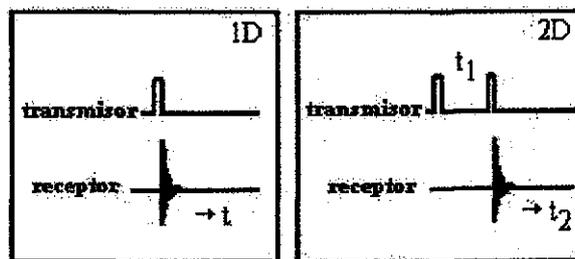
$$P_3 - P_1 = P_4 - P_2 = \delta' + d, \quad (4.16)$$

y como puede verse en la *tabla 4.3*, la intensidad de la absorción de  $I$  será incrementada por  $2d$  sobre su valor de equilibrio. Por otra parte, la saturación de  $S$  causará que  $P_3 - P_1 = \delta'$ , mientras que en equilibrio  $P_3 = P_2$ . Por lo tanto, el efecto de  $W_0$  será incrementar  $P_2$  y disminuir  $P_3$ . Si la cantidad de población transferida de 3 a 2 es definida de nuevo por  $d$ , la intensidad de la absorción será disminuida por  $2d$  (ver *tabla 4.3*).

En un caso real, todas las transiciones serán posibles  $W_1^I, W_2, W_0$  ( $W_1^I$  es poco probable debido a la saturación de  $S$ ).  $W_2$  dará como resultado un *aumento* en la intensidad de la absorción del espín  $I$ , mientras que,  $W_0$  dará como resultado una *disminución* en la intensidad de la absorción del espín  $I$ . El efecto es muy útil para determinar la estructura de las moléculas, aunque solo es posible estudiar dos núcleos que se encuentren muy cerca uno del otro (menos de  $5\text{\AA}$ )

### 4.3. RMN en dos dimensiones

Para explicar la esencia de la *RMN* en dos dimensiones (en dos dimensiones el efecto Nuclear Overhauser es llamado *NOESY*) observemos la *figura 4.4*. El diagrama ilustra el curso del tiempo en los métodos de transformada de Fourier en *RMN* en una (*1D*) y dos (*2D*) dimensiones. En *1D* los espines nucleares son expuestos a un pulso, después del cual la señal es detectada en el receptor como función de un tiempo  $t$ . En *2D* los espines nucleares son sujetos a dos (o más) pulsos, con intervalos de tiempo  $t_1$ . Después del segundo pulso la señal es adquirida en la misma forma que en *1D*, aunque aquí llamaremos al tiempo  $t_2$ . Después de esto, se retorna al inicio de el experimento y se repite para otros valores de  $t_1$ .



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 4.4 Comparación de las señales de *RMN* en 1 y 2D.

Una secuencia de un pulso típico de experimentos de *2D* se muestra en la *figura 4.5*. La primera perturbación (pulso) es llamada *preparación* del sistema de espines, el primer pulso ( $90_x$ ) rota la mag-

netización en equilibrio  $M_z$  (en el equilibrio no hay magnetización transversal  $M_x$  o  $M_y$ ) colocándola sobre el plano  $XY$ . Después sigue un *tiempo de retraso*  $t_1$  durante el cual la magnetización tiene un movimiento de precesión en el plano  $XY$ . El segundo pulso convierte la magnetización en el plano  $XY$  en magnetización en el eje  $Z$ . Este pulso es seguido por un periodo de tiempo denominado *tiempo de mezcla*  $t_m$ . La composición del periodo de mezcla puede variar para cada tipo de experimento. En algunos experimentos puede ser un corto retraso, mientras que en otros una serie de pulsos. Para el experimento *NOESY* el periodo de mezcla es un retraso de 50 – 200 *ms*, tiempo durante el cual ocurre el efecto NOE (*relajamiento cruzado*). El tercer pulso convierte la magnetización en magnetización observable y la señal se detecta en función de  $t_1$  y  $t_2$ .

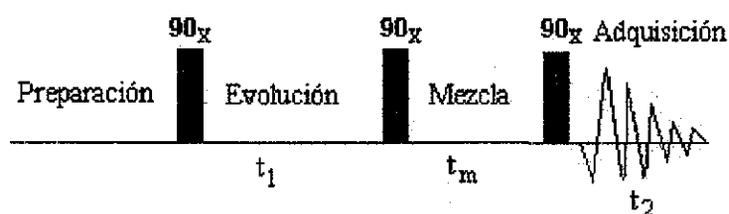


Figura 4.5 Esquema general de un experimento *NOESY*.

El cambio de  $t_1$  modifica la señal medida durante  $t_2$ . Esto proporciona una tabla en dos dimensiones que contiene la intensidad de la señal como función de  $t_1$  y  $t_2$ . Después de la transformada de Fourier con respecto a  $t_1$  y  $t_2$ , uno obtiene el espectro de frecuencias en dos dimensiones en la forma de un mapa mostrando la dependencia de la intensidad de la señal respecto a los dos variables de frecuencia denotadas por  $F_1$  y  $F_2$ . Tal como se muestra en las *figuras* 4.6 y 4.7. En la *figura* 4.7 se muestra un ejemplo de un mapa visto desde arriba, hay picos en una de las diagonales del mapa, así como también fuera de la diagonal. La diagonal divide al espectro en dos partes iguales, los picos en la diagonal son contribuciones de la magnetización que no han sido cambiados por la secuencia de mezcla, tienen igual frecuencia en las dos dimensiones. Los picos que se encuentran fuera de la diagonal se originan por núcleos que intercambian magnetización durante el tiempo de mezcla, indican una interacción entre núcleos con frecuencias distintas en las dos dimensiones. Las contribuciones fuera de la diagonal se deben al efecto NOE.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

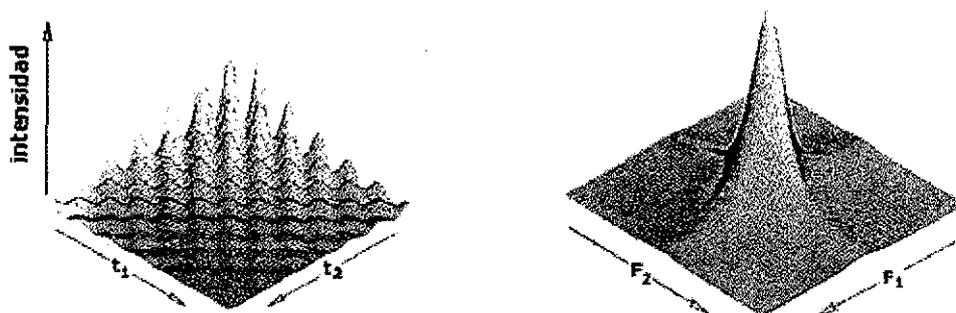
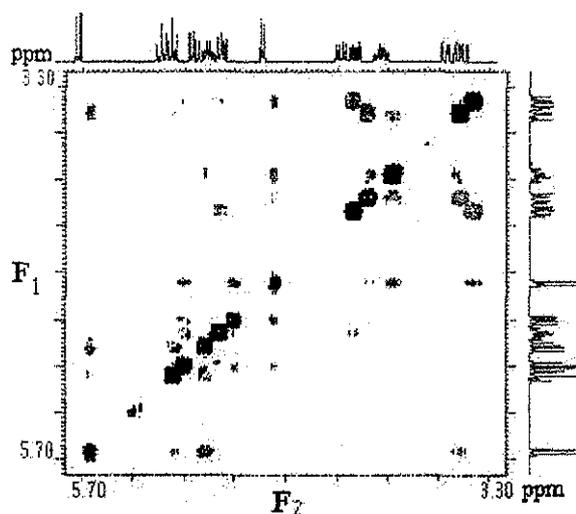


Figura 4.6 Señal de RMN en 2D. Aquí se muestra en el dominio del tiempo y de frecuencia.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 4.7 Espectro de RMN en 2D en la escala  $\delta$ (ppm).

Cuando el efecto *NOE* es observado, la distancia entre dos protones esta dentro de  $5\text{\AA}$  y se tienen tres rangos:

- intensidades *NOE* fuertes: distancias entre protones de  $2.5\text{\AA}$ .
- intensidades *NOE* medias: distancias entre protones de  $3.7\text{\AA}$ .
- intensidades *NOE* débiles: distancias entre protones de  $5\text{\AA}$ .

Una mala interpretación del efecto *NOE* se debe principalmente a la *difusion del espín*. Consideremos tres protones A, B y C. Si A genera un efecto *NOE* en B, entonces el efecto *NOE* en B puede ser difuso para C. Para pequeñas moléculas el efecto *NOE* entre A y B es menor que el esperado ya que algo del efecto *NOE* es difuso desde B. La *difusión del espín* durante los experimentos de RMN disminuye al utilizar la *aproximación de pares de espines aislados (ISPA)*, en la cual sólo se considera la interacción de dos núcleos.

Finalmente se describirá de manera general la dinámica de la magnetización  $M_z$  de un sistema con espines nucleares  $1/2$ , la cual esta dada por la ecuación generalizada de Solomon [23, 50],

$$\frac{dM_z}{dt} = -R \bullet (M_z - M_z^0), \quad (4.17)$$

donde  $M_z$  es un vector  $n \times 1$  con sus elementos  $M_{zi}$  representando la magnetización  $z$  del  $i$ -ésimo espín y  $M_z^0$  representa la magnetización  $z$  en el equilibrio. La matrix de relajación  $R$  con elementos en la diagonal  $\rho_i$  y con elementos  $\sigma_{ij}$  fuera de la diagonal:

$$R = \begin{bmatrix} \rho_1 & \sigma_{12} & \sigma_{13} & \dots & \sigma_{1n} \\ \sigma_{21} & \rho_2 & \sigma_{23} & \dots & \sigma_{2n} \\ \sigma_{31} & \sigma_{32} & \rho_3 & \dots & \sigma_{3n} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \dots & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \dots & \cdot \\ \sigma_{n1} & \sigma_{n2} & \sigma_{n3} & \dots & \rho_n \end{bmatrix}, \quad (4.18)$$

donde

$$\sigma_{ij} = k_{ji}[6J^{ij}(2\nu) - J^{ij}(0)], \quad (4.19a)$$

$$\rho_i = \sum_{j \neq i}^n k_{ji}[J^{ij}(0) - 3J^{ij}(2\nu)] + \rho_i^*. \quad (4.19b)$$

$R$  es la matrix de relajación para sistemas con muchos espines, su análisis completo por integración numérica [51, 52] o por métodos de diagonalización [53 - 56] permite resolver el problema de la *difusión del espín* y hace posible la obtención de distancias interprotónicas más exactas.

Los términos  $\sigma_{ij}$  en la *Ec.*[4.19a] son denominados términos de *relajación-cruzada*, estos términos son los que hacen posible el efecto Nuclear Overhauser. En la *Ec.*[4.19b],  $\rho_i^*$  representa la relajación externa e incluye posibles interacciones de espines lejanos. La constante de proporcionalidad  $k_{ji}$  es inversamente proporcional a la distancia interprotónica,

$$k_{ji} = \frac{\gamma^4 \hbar^2}{10r^{6_{ij}}}, \quad (4.20)$$

y  $J^{ij}(\nu)$  es la densidad espectral del vector que conecta al espín  $i$  con el espín  $j$ , la cual describe la dependencia de la frecuencia de un movimiento. Para una molécula isotrópicas  $J^{ij}$  esta dado por [23]

$$J^{ij}(\nu) = \frac{\tau}{1 + (\nu\tau)^2}, \quad (4.21)$$

donde  $\tau$  es el *tiempo de correlación*, el cual caracteriza al movimiento que causa la relajación.

Utilizando la Ec. [4.18] las intensidades de los los picos cruzados NOE, pueden ser calculadas [23, 57, 58]

$$I_{ij} = [\exp(-Rt_m)]_{jj} M_{zj}(0), \quad (4.22)$$

donde  $t_m$  es el *tiempo de mezcla* y  $M_{zj}(0)$  es la magnetización  $z$  del  $j$ -ésimo proton antes del primer pulso de rf [57].

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# Capítulo 5

## Resultados

La espectroscopía de  $RMN^1$  ha progresado rápidamente en los últimos años [59 – 61] y es una de las herramientas más poderosas para la deducción de estructuras moleculares. Las bases de la  $RMN$  para la determinación de estructuras es el efecto Nuclear Overhauser ( $NOE$ )<sup>2</sup>. El efecto  $NOE$  da un conjunto de datos con los que se pueden formular restricciones para las distancias interprotónicas.

Al ser los dúplex de ADN estructuras heterogéneas, flexibles y dinámicas, sus parámetros de conformación varían en un amplio rango. Un fragmento de ADN en solución puede tener una gran variedad de conformaciones y se encuentra predominantemente en la *forma B*. Aún cuando un número de factores que contribuyen a la determinación exacta de estructuras de  $RMN$  han sido identificados [18 – 20], es muy difícil verificar en cada caso particular, que tan “real” es la estructura determinada debido a que no de tienen “patrones” que puedan ser utilizados para comparar. Los datos comúnmente disponibles de  $RMN$  no son suficientes para determinar estructuras exactas de fragmentos de ADN. Por lo que es necesario hacer un análisis teórico de conformación utilizando cálculos de energía de interacciones no-enlazadas y los métodos de la Mecánica Molecular, para obtener las conformaciones de mínima energía y algunas regularidades importantes que ayudarían a entender la estructura del ADN.

El fragmento de ADN estudiado en este trabajo se denomina *Octámero*, es una doble hélice de *forma*<sup>3</sup> *ADN-B* compuesta por ocho pares de bases que alternan las cuatro bases que componen al ADN, esto es, dos purinas Guanina (G) y Adenina (A), y dos pirimidinas Citosina (C) y Timina (T). El *Octámero* es un *octa-nucleótido* con la siguiente secuencia en la cadena polinucleotídica que denominaremos *A*: *C T G T A C A G*, y en su cadena complementaria denominada *B*: *G A C A T G T C*. El objetivo de este capítulo es hacer un análisis teórico de conformación para el *Octámero*, comparar los resultados teóricos con los resultados experimentales y elegir las conformaciones con intensidades  $NOE$  más cercanas a las experimentales.

De  $RMN$  se obtuvieron la secuencia primaria del *Octámero* y las intensidades  $NOE$  experimentales de pares de protones. El análisis teórico de conformación (*sección 5.1*) se inició con la búsqueda de un conjunto de conformaciones de mínima energía y con la obtención de los parámetros de conformación.

---

<sup>1</sup>En el Capítulo 4 se presentó una introducción a la RMN.

<sup>2</sup>En el Capítulo 4, sección 4.2 se describió el efecto NOE.

<sup>3</sup>Las características de una hélice regular de forma ADN-B fueron descritas en el Capítulo 1, sección 1.3.

En la *sección 5.2* se hizo una selección de las intensidades *NOE* experimentales, la cual se basó en la elección de las intensidades interprotónicas más confiables. Para estos pares de protones en la *sección 5.3* se realizó un análisis de las distancias interprotónicas de las conformaciones obtenidas en la *sección 5.1*. El análisis consistió en seguir los cambios de las distancias interprotónicas con respecto a los parámetros de conformación y sirvió para elegir que distancias interprotónicas que se ajustaron en la *sección 5.5*. En la *sección 5.4* se calcularon las intensidades *NOE* teóricas para las conformaciones obtenidas en la *sección 5.1*. Finalmente, en la *sección 5.5* se impusieron restricciones en las distancias interprotónicas (las de la *sección 5.3*) para ajustar las intensidades *NOE* calculadas con las experimentales. El proceso se realizó varias veces hasta proponer una conformación, cuyas intensidades *NOE* calculadas son más cercanas a las experimentales. En la *figura 5.1* se muestra un diagrama descriptivo del procedimiento que se siguió para la obtención de estas estructuras.

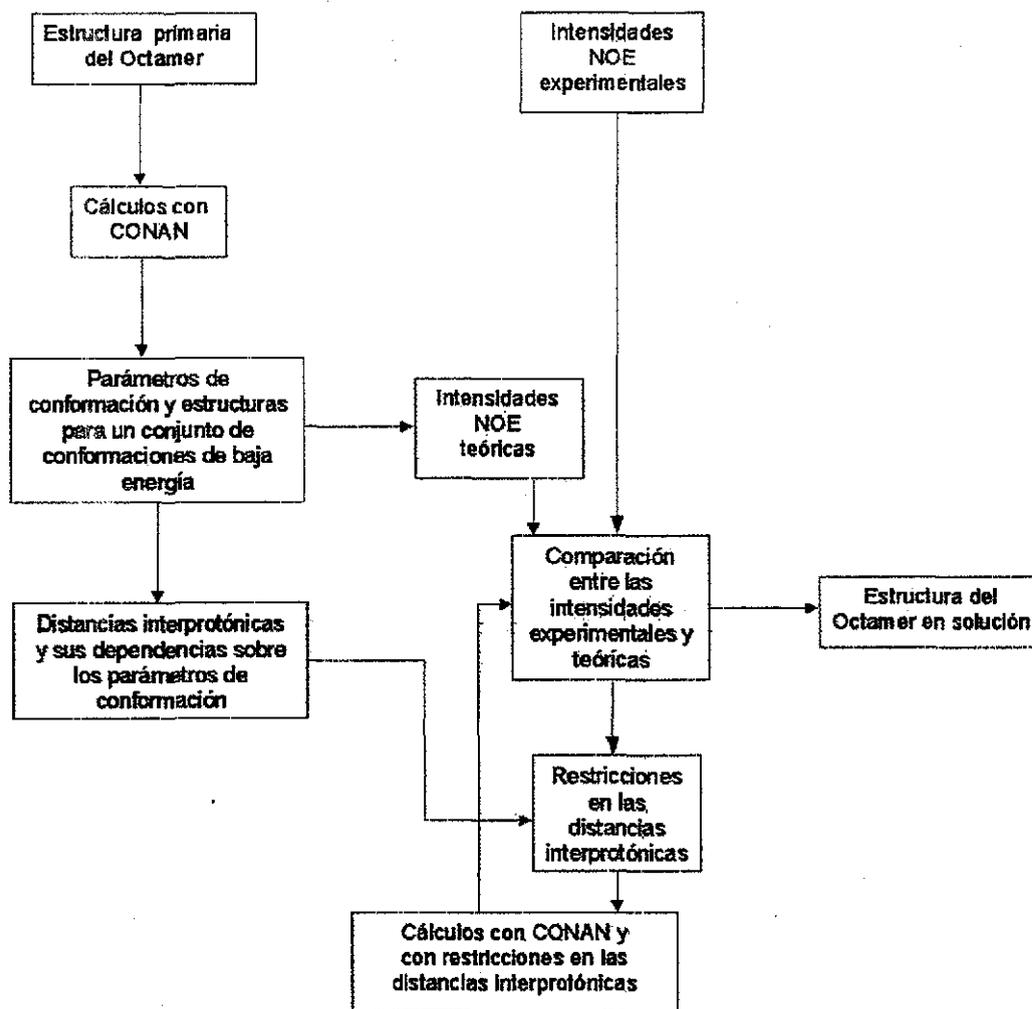


Figura 5.1 Diagrama del procedimiento

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 5.1. Análisis teórico de conformación para el *Octámero*.

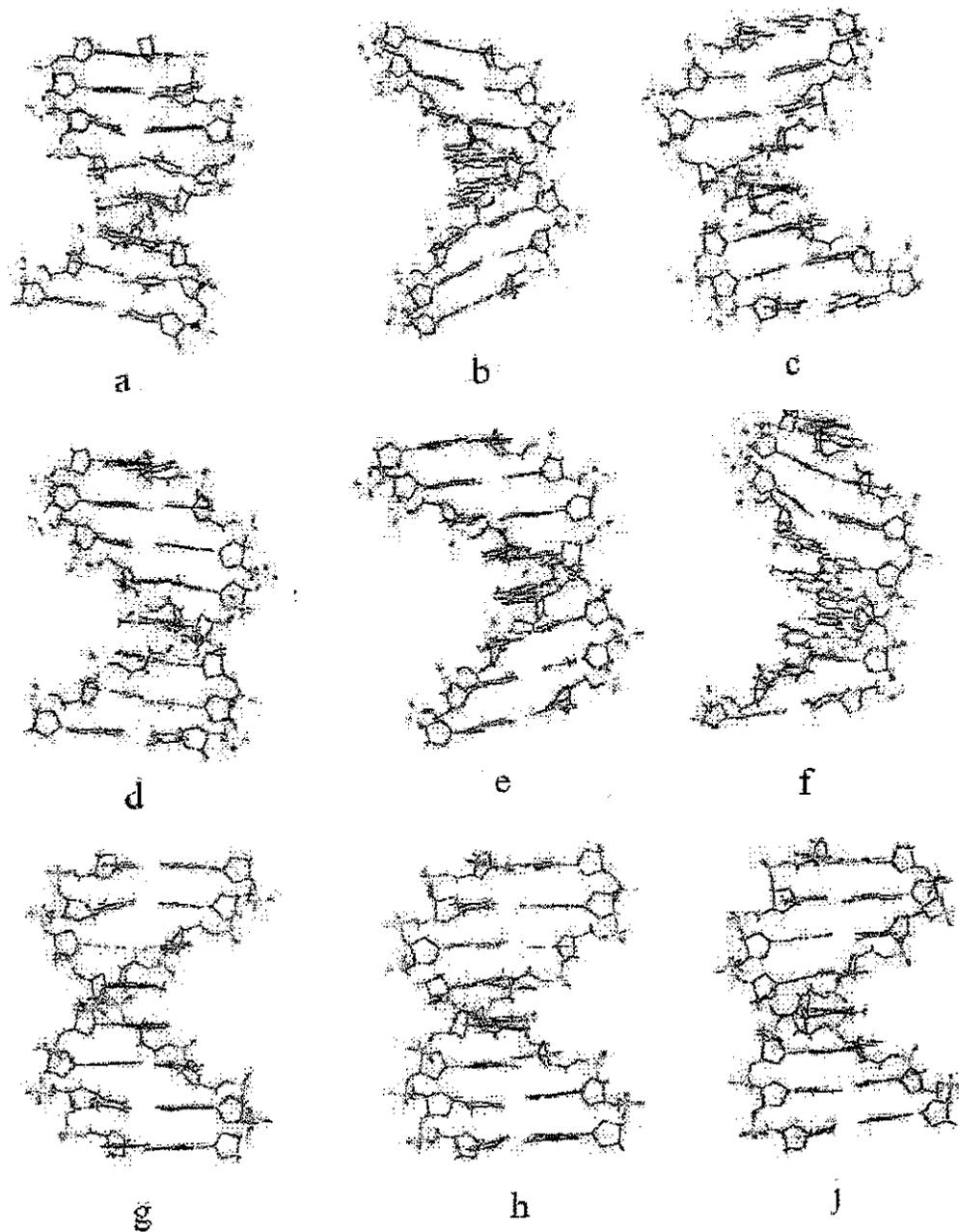
Usando el programa CONAN se obtuvieron más de 100 conformaciones de baja energía para el *Octámero*. Se consideraron conformaciones con pares de bases de Watson-Crick sin tomar en cuenta la posibilidad de la apertura del par de bases terminal. Como éstos pares son G:C, esta apertura no puede ser substancial. Durante todos los cálculos nunca se observó el rompimiento de los enlaces de hidrógeno entre bases en un par, aunque distorsiones considerables en su planaridad tuvieron lugar. Algunas de las conformaciones para el *Octámero* fueron obtenidas por minimización libre empezando con conformaciones iniciales, las cuales corresponden a diferentes estructuras de la familia B. La minimización libre generalmente da lugar a cambios en el plegamiento de la unidad de azúcar de una, dos o tres pirimidinas desde la forma  $C2' - endo$  a la forma  $O4' - endo$ .

Si se fija el plegamiento de la unidad de azúcar la tendencia más probable es hacia la forma  $O4' - endo$  para los nucleótidos con pirimidinas, una o dos de las otras unidades de azúcar de estos nucleótidos cambiará su estructura a esta forma. Al continuar la minimización libre de algunas de estas estructuras resultan en la forma  $C3' - endo$  para la unidad del azúcar de uno de los nucleótidos con pirimidinas. Para obtener plegamientos de la unidad de azúcar  $O4' - endo$  de los nucleótidos de la cadena A:  $C1$   $T2$  y  $T4$ , se graduaron los cambios en los ángulos de torsión de estas unidades de azúcar a la región de valores  $O4' - endo$ . Por cambios graduales de algunas de las variables (como por ejemplo los ángulos de inclinación (tilt)  $\tau$ ), seguidos por una minimización libre sobre ciertas variables y fijando otras (por ejemplo ángulos de torsión de las unidades de azúcar de las pirimidinas), se obtuvieron una variedad de conformaciones con diferentes valores de sus parámetros helicoidales y de los plegamientos de la unidad de azúcar de los nucleótidos con pirimidinas. Algunas otras conformaciones fueron obtenidas imponiendo restricciones sobre los valores de los ángulos  $\tau$  o sobre la longitud total del *Octámero* (para mantener los parámetros helicoidales promedios del *Octámero* casi iguales a los del ADN en cristales y soluciones).

En este trabajo se analizaron parte de estas conformaciones, se omitieron aquellas con valores cercanos a la mayoría de los parámetros de conformación. Estas conformaciones difieren significativamente en parámetros tales como  $\Omega$  (ver *fig. 1.8*), distancias entre pares de bases adyacentes  $H$ , en ángulos  $\tau$ ,  $\rho$  y  $\pi$  (ver *fig. 1.8*), así como también en los plegamientos de sus unidades de azúcar de nucleótidos con pirimidinas. Cabe mencionar que los nucleótidos con purinas no tienen la tendencia a cambiar su plegamiento de la unidad de azúcar de la forma  $C2' - endo$ . Algunas de estas estructuras se muestran en la *figura 5.2* y sus principales parámetros de conformación se encuentran en la *tabla 5.1*.

Algunas correlaciones entre los parámetros de conformación mencionadas hace tiempo tanto en tra-

bajos experimentales [1] como de cómputo [24] pueden ser seguidas de estos resultados, pero no serán examinadas. Es importante mencionar una característica interesante de una de las conformaciones (figura 5.2) llamada *a*, la cual presenta la formación de un enlace de hidrógeno entre dos pirimidinas de diferentes cadenas de pares vecinos. Aunque esta conformación no corresponde a datos de *RMN*, tal característica puede existir en dobles hélices bajo ciertas condiciones en solución o en los procesos biológicos.



**Figura 5.2** Algunas de las conformaciones que se obtuvieron para el Octámero. En la tabla 5.1 se encuentran sus principales parámetros de conformación.

Tabla 5.1

Principales parámetros de conformación para las estructuras denominadas a, b, c, d, e, f, g, h y j. Los ángulos  $\Omega$ ,  $\tau$ ,  $\kappa$ ,  $\rho$ ,  $\pi$ , la fase y el ángulo glicosídico  $\chi$  están dados en grados. Los desplazamientos DX y DY, así como la distancia entre pares de bases adyacentes H, se dan en Å y la energía E, en kcal/mol. Los valores de H y  $\Omega$  corresponden a pares de bases adyacentes. La primera (segunda) columna de la fase y de  $\chi_I$  ( $\chi_D$ ) corresponden a valores de la hélice A (B).

a E=-173.2												
HELICE	H	$\Omega$	$\tau$	$\kappa$	$\rho$	$\pi$	DX	DY	FASE		$\chi_I$	$\chi_D$
! C:G !	3.2	30.2	1	-6.1	12.5	3.3	1.2	-0.1	24.5	177.4	94.8	123.8
! T:A !	3.8	39.2	5	2.7	12.9	9.8	1.2	0	34.4	149.4	93.7	135.9
! G:C !	2.9	31.8	4.6	-20	1.8	4.5	0.8	0.4	173.5	37.2	138.1	84.8
! T:A !	3.3	40.1	12.6	9	8.0	12.7	1.1	-0.4	46.9	177.5	97.3	138.5
b E=-149.9												
! C:G !	3.6	37.6	-16.1	-0.9	-7.5	1.8	-0.8	-0.3	144.9	158.2	115.6	111.1
! T:A !	3.8	34.9	-16.7	6.9	-2	3.6	-0.5	0.3	146.6	146.5	125.9	128.7
! G:C !	3.03	44.1	-20.4	5.1	4.6	-1.1	-0.2	0.4	171.3	137.9	128.3	108.6
! T:A !	3.7	35.5	-14.7	0.3	1.4	1	-0.3	-0.1	148.6	160.7	121.2	127.3
c E=-168.6												
! C:G !	4.2	40.7	-9.4	6.2	17.9	-4.8	0.8	-0.9	24.6	158.7	82	90.5
! T:A !	3.5	30.2	3.2	-8.7	-0.6	4.2	-0.1	0	141.5	164.1	125.3	134.1
! G:C !	2.8	34.4	-2.3	15.7	-3.9	1.3	0.2	1.0	172.3	64.8	133.9	89.5
! T:A !	3.6	39.2	2.3	10.1	4.6	12.7	1.2	-0.0	45.1	172.4	95.1	137.8
d E=-158.3												
! C:G !	3.4	39.8	-2.8	3.7	9	2.8	1.4	-0.2	25.9	165.1	89.0	113.4
! T:A !	3.4	32.8	2.1	2.3	-3.6	3.2	0.8	-0.1	42.1	153.3	123.4	134.8
! G:C !	3.1	36.8	-2.8	-1.2	-3.2	1.9	1.1	0.2	143.7	136.5	128.7	115
! T:A !	3.4	35.3	-0.9	3.1	-0.1	6.3	1.4	0	43.8	146.4	124.5	130.4
e E=-153.6												
! C:G !	4	35.3	-11	10.7	5.7	-4.4	1.3	-0.2	145	167.6	107.9	107.5
! T:A !	3.6	34	-2.4	-1.3	0.9	4	1	0	145.4	149.6	123.3	129.4
! G:C !	3.1	37.5	-5.8	-7.7	0.6	0	1.1	0.2	151.7	139.5	129	113.1
! T:A !	3.5	34.3	-4.2	-0.1	0.7	2.5	1.1	0	142.9	145.8	123.1	126.7

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

<i>f</i> E = -153.5												
! C:G !	4.9	36.2	-23.1	13.1	3.6	-8.5	-0.1	-0.4	139.1	156.2	95.7	93.7
! T:A !	3.9	32.8	-11.6	-15.8	2.2	3.4	-0.1	0.2	147.3	154.3	124.4	124.6
! G:C !	2.9	42.3	-16.2	-23.4	1.4	-1.8	0.2	0.5	170.7	130.9	130	104.7
! T:A !	3.5	33	-11.9	-2.4	-0.8	-0.3	0.1	-0.1	145.5	153.6	124.9	128.9
<i>g</i> E = -152.6												
! C:G !	3.1	37.7	-1.2	4.5	5.5	-0.5	0.7	0.2	68.3	165.6	100.2	128.4
! T:A !	4.5	32.3	-5	16.7	3.8	7.1	1.3	-0.2	44.7	169.6	76.1	131
! G:C !	2.9	41	-4.4	-16.1	-2.2	-0.2	0.8	0.3	167.5	128.2	132.4	105.3
! T:A !	3.3	32.2	-2.3	-1.3	-1.8	1.8	0.7	-0.1	144.1	149.5	128.4	132.6
<i>h</i> E = -150.9												
! C:G !	3.1	37.3	4.9	-7.1	6.8	3	0.6	0.3	81.6	166.5	113.6	133.1
! T:A !	3.4	32.1	-0.1	6.6	1.8	4.1	1.1	-0.4	67.4	170.9	96.3	131.3
! G:C !	3.1	39.6	0	1.8	-0.4	3.2	0.8	0	144.8	135.8	131.5	122.4
! T:A !	3.5	34.8	0.9	5.1	1.3	7.1	1.1	-0.1	141	158.9	123.1	131.8
<i>j</i> E = -150.8												
! C:G !	3.1	37.3	4.9	-7.1	6.8	3	0.6	0.3	81.6	166.4	113.6	133.1
! T:A !	3.4	32.1	-0.1	6.6	1.7	4.1	1.1	-0.3	67.4	170.8	96.3	131.3
! G:C !	3.1	39.6	0	1.8	-0.4	3.2	0.8	0	144.9	136.1	131.5	122.5
! T:A !	3.5	34.8	0.9	5.1	1.3	7.1	1.1	-0.1	140.6	158.9	123.1	131.8

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

## 5.2. Análisis de los resultados *NOE* experimentales.

La estructura primaria estudiada en este trabajo fue determinada por *RMN*<sup>4</sup> utilizando el efecto *NOE*<sup>5</sup> en dos dimensiones (2D) y fue proporcionada por el Dr. Robert Eaton del departamento de Química de la Universidad de Londres. En la *tabla* 5.2 se encuentran los cambios químicos<sup>6</sup> y en la *figura* 5.3 se muestra el espectro 2D del *Octámero*. El espectro fue calculado para los *tiempos de mezcla*<sup>7</sup> de 50 – 200 ms .

<sup>4</sup>En el Capítulo 4 se presentó una introducción a la RMN.

<sup>5</sup>En el Capítulo 4, sección 4.2 se describió el efecto NOE.

<sup>6</sup>El cambio químico es la diferencia entre la  $\nu_L$  de un núcleo y la  $\nu_0$  de referencia. Ver detalles en el Capítulo 4.

<sup>7</sup>En el Capítulo 4, sección 4.3 se definió el tiempo de mezcla.

De la tabla original de las intensidades NOE experimentales se observó que no hay intensidades entre nucleótidos de cadenas distintas y que las intensidades entre protones de nucleótidos adyacentes son en general pequeñas.

En muchas moléculas, algunos protones son indistinguibles por RMN y generan un solo pico. Este es el caso para los protones H6...H21'(H22') de C8, como puede observarse en la tabla 5.3 tienen la misma intensidad, esto se debe a que tienen el mismo *cambio químico* y por lo tanto son indistinguibles para el espectro NOE. Estos picos son ineficaces para la construcción de la estructura. Para los protones H51'...H52', es decir, para el par de protones del carbono C5' de las unidades de azúcar, tampoco hay pico y en general se observó que los picos de los protones adyacentes en las unidades de azúcar no son confiables, por lo que no fueron considerados. Así, los picos obtenidos de NOE fueron agrupados y los más importantes están relacionados con a) distancias intra-azúcar, b) distancias intra-nucleótidos y c) distancias inter-nucleótidos. Por lo que se utilizó el conjunto de picos que se muestra en la tabla 5.3.

Sabemos que las intensidades están relacionadas con la distancia interprotónica  $r$  y que es inversamente proporcional a  $r^6$ , por lo que intensidades grandes nos indicaran que tenemos distancias interprotónicas pequeñas y viceversa. También es conocido que al incrementar el tiempo de mezcla se obtienen picos más grandes, por lo que algunas intensidades de la tabla 5.3 tienen que ser ignoradas ya que no presentan cambios monótonos. Este hecho se debe principalmente a que se tienen errores experimentales. La intensidad más importante es la de 50 ms ya que en este caso es válida la suposición de que solo interactúan dos núcleos uno con el otro.

Tabla 5.2  
Cambio Químico (ppm)

Residuo	H8/H6	H2/H5/Me	H1'	H21'	H22''	H3'	H4'	H51'	H52''
G1	7.95		5.59	2.53	2.72	4.85	4.16	4.11	4.19
A2	8.27		6.27	2.75	2.94	5.05	4.46	4.11	4.17
C3	7.28	5.29	5.58	2.05	2.42	4.82	4.15	4.16	4.23
A4	8.23	7.54	6.24	2.64	2.94	5.01	4.42	4.11	4.17
T5	7.13	1.41	5.76	2.11	2.43	4.93	4.16	4.16	4.2
G6	7.79		5.96	2.59	2.73	4.91	4.37	4.16	4.2
T7	7.31	1.4	6.11	2.14	2.5	4.87	4.25	4.16	4.2
C8	7.63	5.74	6.27	2.27	2.27	4.56	4	4.16	4.05

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Octamer (C2), 200ms mixing time, 298K, 11/10/00

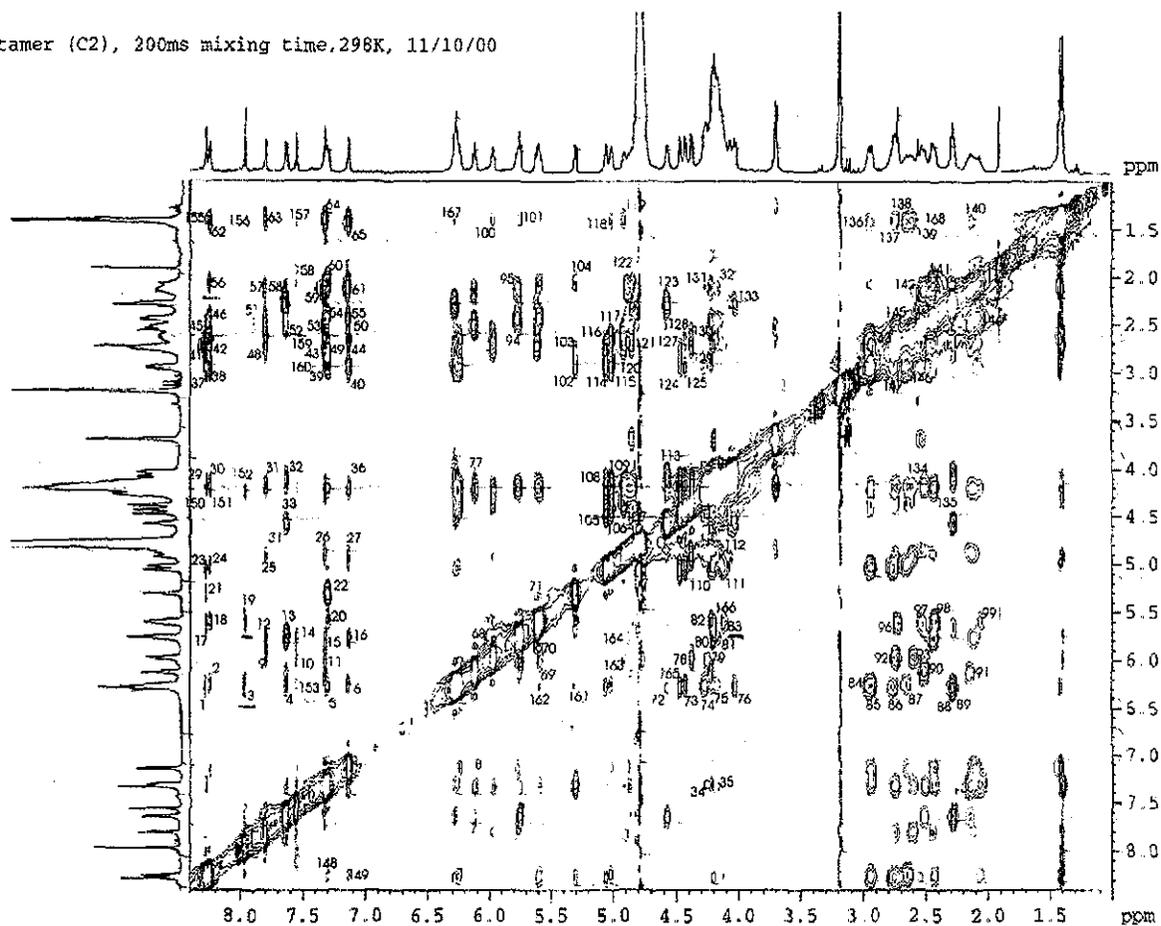


Figura 5.3 Espectro del Octámero proporcionado por el Dr. Robert Eaton del departamento de Química de la Universidad de Londres.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 5.3**

*Picos seleccionados del Octámnero. Las intensidades corresponden a tiempos de mezcla de 50-200 ms. a) Picos relacionados con las distancias intra-azúcar, b) picos relacionados con las distancias intra-nucleótidos y c) picos relacionados con las distancias inter-nucleótidos.*

Picos		Notas	Intensidad			
a)			50 ms	100 ms	150 ms	200 ms
H1' G1	H4' G1	V	0.127	0.287	0.333	0.470
H1' A2	H4' A2	*	0.187	0.288	0.265	0.285
H1' C3	H4' C3	P	0.164	0.479	0.358	0.320
H1' A4	H4' A4	P	0.253	0.352	0.353	0.296
H1' T5	H4' T5	P	0.112	0.269	0.347	0.453
H1' G6	H4' G6	*	0.237	0.286	0.296	0.346
H1' T7	H4' T7	*	0.493	0.621	0.635	0.700
H1' C8	H4' C8	*	0.203	0.237	0.299	0.291
b)						
H8 G1	H1' G1	*	0.105	0.091	0.101	0.101
H8 A2	H1' A2	P	0.089	0.050	0.052	0.114
H8 A4	H1' A4	P	0.081	0.164	0.181	0.119
H8 G6	H1' G6	P,L	0.074	0.062	0.076	0.089
H6 C3	H1' C3	P	0.103	0.114	0.125	0.153
H6 T5	H1' T5	*	0.072	0.126	0.110	0.145
H6 T7	H1' T7	*	0.113	0.128	0.146	0.185
H6 C8	H1' C8	*	0.090	0.095	0.100	0.136
H8 A2	H21'A2	V	1.767	1.792	1.743	1.681
H8 A4	H21'A4	V	2.474	2.553	2.309	1.179
H8 G6	H21'G6	V	0.536	0.587	0.574	0.460
H6 C3	H21'C3	V	3.027	3.188	2.854	2.267
H6 T5	H21'T5	*	1.782	1.846	1.610	1.506
H6 T7	H21'T7	V	2.190	1.684	1.549	1.790
H6 C8	H21'C8	P	1.302	1.546	1.460	1.484

H8 A2	H22'A2	V	0.366	0.278	0.354	0.625
H8 A4	H22'A4	V	0.329	0.724	0.570	0.447
H8 G6	H22'G6	V	0.869	0.976	0.942	0.939
H6 C3	H22'C3	V	0.363	0.508	0.615	0.529
H6 T5	H22'T5	P	0.206	0.366	0.440	0.503
H6 T7	H22'T7	V	0.519	0.573	0.776	0.821
H6 C8	H22'C8	P	1.302	1.546	1.460	1.484
H8 A2	H3' A2	P	0.046	0.060	0.101	0.114
H8 A4	H3' A4	P	0.052	0.095	0.162	0.103
H8 G6	H3' G6	*	0.043	0.052	0.054	0.063
H6 T5	H3' T5	*	0.101	0.095	0.103	0.128
H6 T7	H3' T7	P	0.210	0.161	0.152	0.154
H6 C8	H3' C8	*	0.259	0.329	0.342	0.360
c)						
H8 A4	H1' C3	P	0.063	0.167	0.147	0.111
H8 G6	H1' T5	P	0.144	0.140	0.155	0.151
H6 C3	H1' A2	P	0.151	0.165	0.206	0.215
H6 T5	H1' A4	*	0.161	0.123	0.136	0.164
H6 T7	H1' G6	*	0.120	0.156	0.197	0.176
H6 C8	H1' T7	*	0.113	0.128	0.146	0.185
H6 C8	H1' T7	*,L	0.042	0.054	0.092	0.091
H8 A2	H5 C3	*,L	0.031	0.051	0.050	0.066
H8 A2	H6 C3	L	0.018	0.043	0.058	0.072
H8 A4	H6 T5	L	0.004	0.033	0.038	0.049
H6 T7	H5 C8	P,L	0.032	0.062	0.053	0.069

\* Pico bien separado.

P Pico parcialmente ocluido.

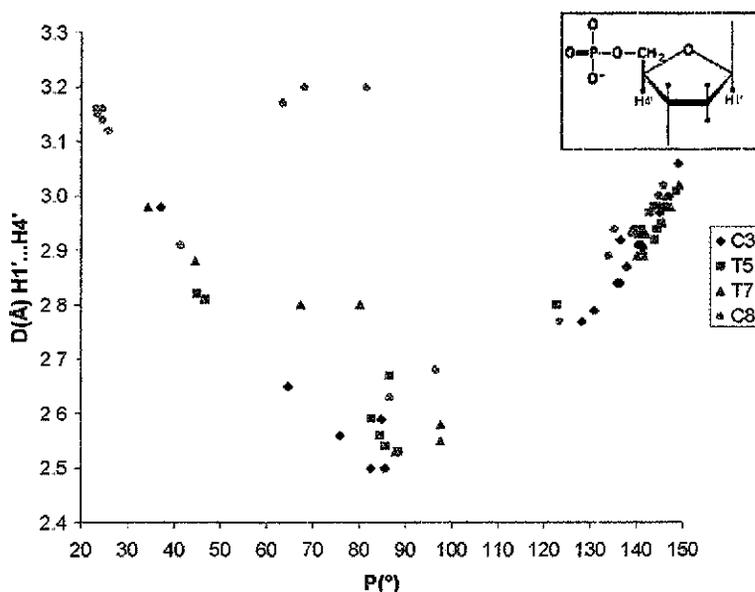
V Pico mal separado - resolución escasa.

L Pico con intensidad reducida - menos de 10 % para H5 - H6 para 200 ms.

### 5.3. Análisis de las conformaciones obtenidas para el *Octámero*.

El ajuste de las conformaciones del *Octámero* a los datos *NOE* se inició con el análisis de las distancias interprotónicas dentro de cada uno de los nucleótidos. Para algunas de las conformaciones del *Octámero* se construyeron las dependencias del ángulo glicosídico  $\chi$  y el ángulo fase  $P$  con las distancias interprotónicas  $D$ .

La primera dependencia (*gráfica 5.1*) es para la distancia entre los protones  $H1'$  y  $H4'$  de la unidad de azúcar (mostrada en el recuadro). Esta distancia es independiente de la base, caracteriza a la unidad de azúcar y solo se construyó la dependencia para las pirimidinas ya que las purinas no presentan grandes cambios. Como puede verse en la *gráfica 5.1* al cambiar de la región  $C2' - endo$  (ángulo fase  $P$  grande) a la región  $C3' - endo$  (ángulos fase  $P$  pequeño) aparece un "mínimo" el cual corresponde a la región  $04' - endo$ . En general se tiene este tipo de comportamiento (parábola) donde las distancias más pequeñas se encuentran en la región  $04' - endo$ . Los puntos adicionales que no siguen el comportamiento parabólico en la *gráfica 5.1*, corresponden al nucleótido  $C8$  para el cual se impusieron restricciones en esta distancia para ajustar los datos al experimento (ver sección 5.5).



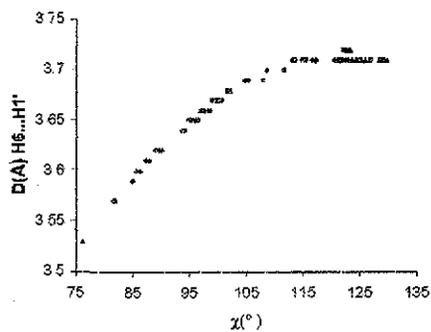
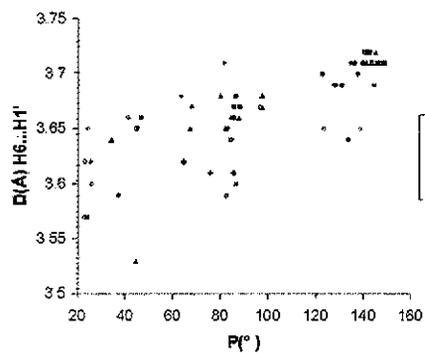
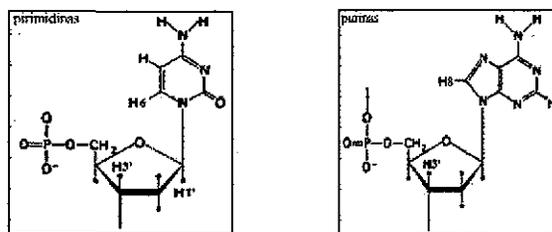
Gráfica 5.1 Dependencia del ángulo fase  $P$  con la distancia interprotónica  $D$ , para las distancias entre los protones  $H1'$  y  $H4'$  de la unidad de azúcar (ver recuadro). Solo se consideraron los cambios en las pirimidinas.

También se construyeron las dependencias  $PvsD$  y  $\chi vs D$  para las distancias de intra-nucleótidos.

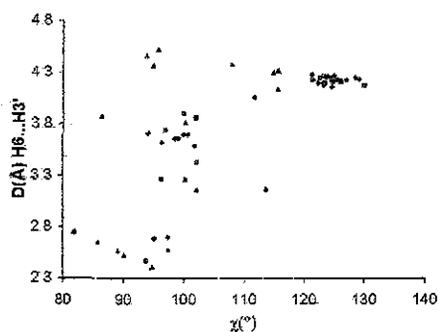
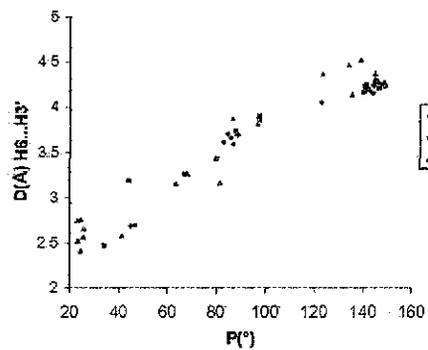
La primera de ellas fue para la distancia entre los protones H6 y H1' (*gráfica 5.2 (a)*), la cual depende prácticamente solo del ángulo glicosídico. Se consideraron solo las dependencias para las pirimidinas ya que para las purinas se obtuvieron prácticamente las mismas distancias. La tendencia de la distancia a disminuir con la disminución de  $P$  y de  $\chi$ , puede observarse en la *gráfica 5.2 (a)*, pero estos cambios en las distancias son muy pequeños para que sean considerados con detalle (menos de  $0.2\text{\AA}$ ).

Las otras distancias de intra-nucleótidos que se consideraron fueron entre los protones H8(H6) y H21'(H22'), y entre los protones H8(H6) y H3'. Estas distancias caracterizan a la conformación de los nucleótidos y dependen de  $P$  y de  $\chi$ . En general los cambios en las purinas no son considerados debido a que sus cambios en las distancias interprotónicas son muy pequeños, tal como se puede ver en las *gráficas 5.2 (c) y 5.3 (c)*, para las distancias H8...H3' y H8...H22', respectivamente. Los cambios en las distancias no son más de  $0.25\text{\AA}$  para las diferentes conformaciones. Mientras que para las pirimidinas los cambios en las distancias son considerables tal como se muestra en las *gráficas 5.2 (b) y 5.3 (a) - (b)*, para las distancias H6...H3', H6...H21' y H6...H22', respectivamente. En la *gráfica 5.2 (b)* se puede observar que para los ángulos fase  $P$  que corresponden a la región  $C2' - endo$  (ángulo fase  $P$  grande) las distancias H6...H3' son más grandes que para la región  $C3' - endo$  (ángulos fase  $P$  pequeño) por alrededor de  $2\text{\AA}$ ; también podemos observar la tendencia de la distancia a disminuir con la disminución de  $\chi$ , los cambios en las distancias son de alrededor de  $2\text{\AA}$ . Para las distancias H6...H21' y H6...H22', la tendencia de la distancia a disminuir con  $P$  y  $\chi$  puede observarse en las *gráficas 5.3 (a) y (b)*, respectivamente. Los cambios en las distancias H6...H21' son menores de  $2\text{\AA}$  (*gráfica 5.3 (a)*), mientras que para las distancias H6...H22' los cambios son de alrededor de  $1\text{\AA}$  (*gráfica 5.3 (b)*).

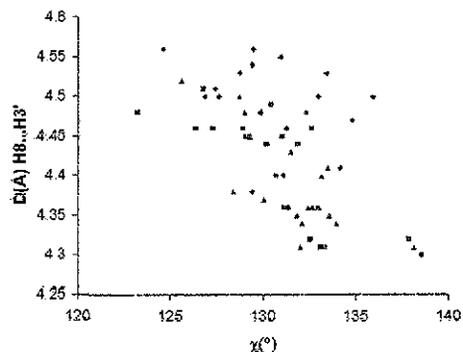
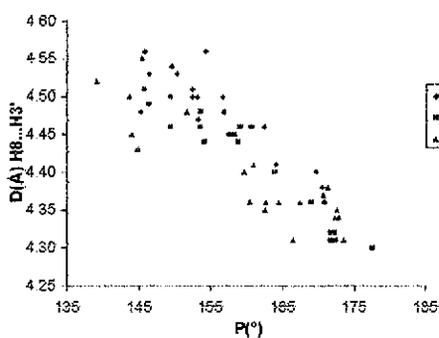
Estas dependencias serán utilizadas en la *sección 5.5* para seleccionar las conformaciones del *Octámero* (calculadas utilizando el programa *CONAN*), que son más cercanas a la conformación en solución.



(a)

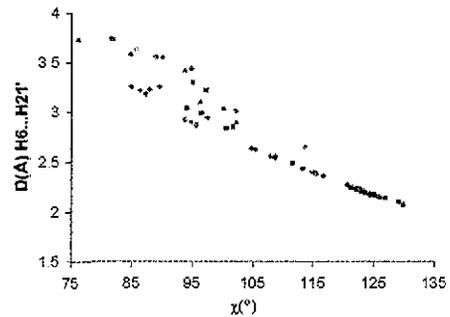
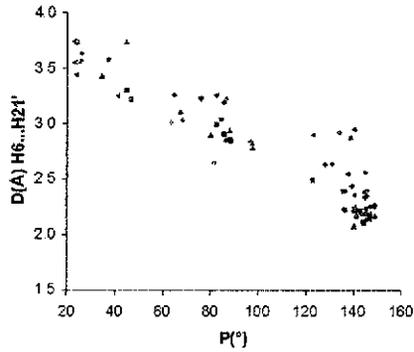
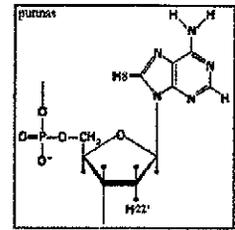
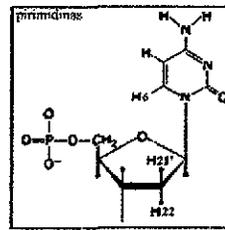


(b)

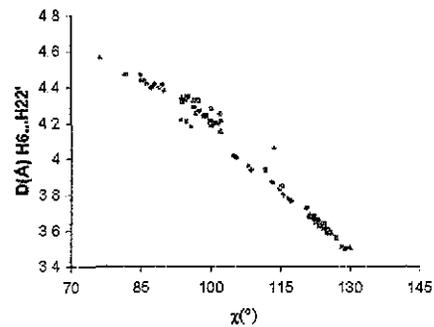
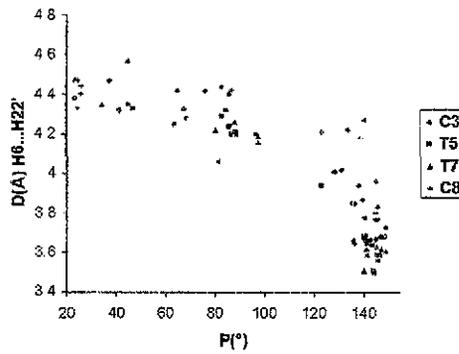


(c)

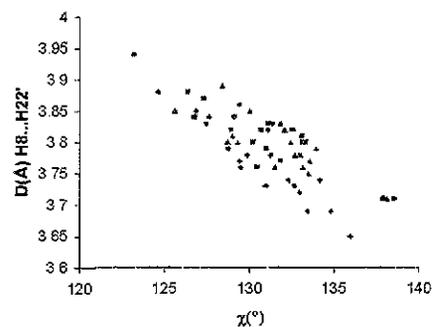
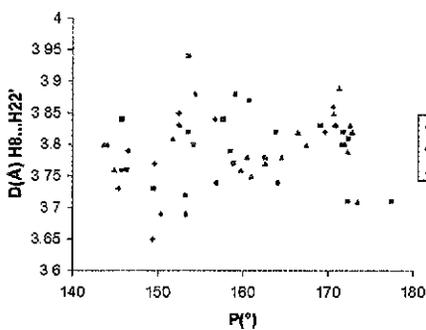
Gráfica 5.2 Dependencias de la distancia  $D$  con respecto a los ángulos  $P$  y  $\chi$ . (a) Dependencias para la distancia entre protones  $H6$  y  $H1'$  de las pirimidinas (ver recuadro). (b) Dependencia para la distancia entre los protones  $H6$  y  $H3'$  de las pirimidinas (ver recuadro) (c) Dependencia para la distancia entre los protones  $H8$  y  $H3'$  de las purinas (ver recuadro).



(a)



(b)



(c)

Gráfica 5.3 Dependencias de la distancia  $D$  con respecto a los ángulos  $P$  y  $\chi$ . (a) Dependencias para la distancia entre protones  $H6$  y  $H21'$  de las pirimidinas (ver recuadro). (b) Dependencia para la distancia entre los protones  $H6$  y  $H22'$  de las pirimidinas (ver recuadro). (c) Dependencia para la distancia entre los protones  $H8$  y  $H22'$  de las purinas (ver recuadro).

## 5.4. Cálculos teóricos de las intensidades *NOE* para varias conformaciones del *Octámero*.

Existen varios programas que permiten calcular las intensidades *NOE* [23, 51, 52] utilizando las coordenadas interprotónicas de alguna estructura en particular. Estos programas se basan en el análisis completo de la matriz de Solomon [50] (ver la *Ec.4.17*), por integración numérica [51, 52] o por métodos de diagonalización [53 – 56]. Esta matriz es la matriz de relajación para sistemas con muchos espines y su solución permite resolver el problema de difusión del espín (descrito en el Capítulo 4, sección 4.3) y hace posible la obtención de distancias interprotónicas más exactas.

Para calcular las intensidades de las conformaciones que se obtuvieron para el *Octámero*, se utilizó el programa *BIRDER* [23]. El programa permite la relajación de protones con diferentes ambientes químicos, considerando automáticamente la recuperación incompleta de la magnetización al utilizar tiempos de retraso para la relajación lo suficientemente largos para asegurar que el sistema de espines este cercano a su completa relajación. Y tiene la opción de incorporar los modos de decaimiento anisotrópicos para moléculas no esféricas.

El programa *BIRDER* necesita como datos de entrada un conjunto de distancias interprotónicas, así como el *tiempo de correlación*, los *tiempos de mezcla* y el *tiempo de retraso* para la relajación.<sup>8</sup>

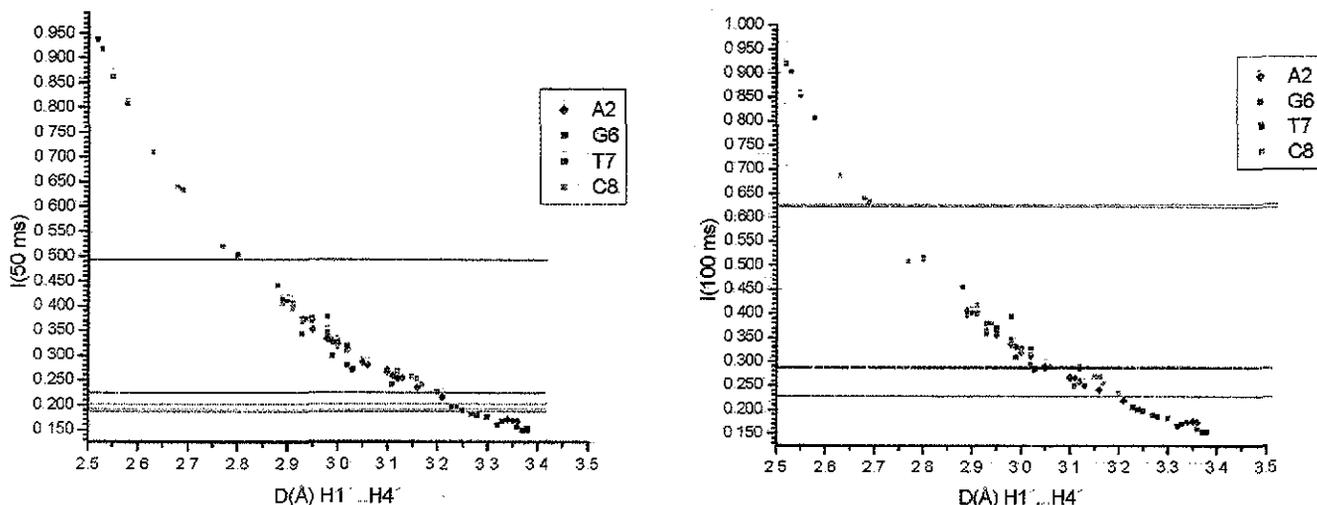
A partir de las coordenadas interprotónicas obtenidas para cada conformación del *Octámero* (los archivos PDB), se obtuvieron las intensidades para un *tiempo de correlación de 3ns*, un *tiempo de retraso* de 2.41s y para cuatro *tiempos de mezcla* de 50 – 200 ms. Se consideró que los modos de decaimiento son isotrópicos ya que para ácidos nucleicos con menos de 10 pares de bases esta consideración es válida [62].

Las intensidades obtenidas con el programa *BIRDER* para las conformaciones del *Octámero* no están en la misma escala que las intensidades experimentales de la *tabla 5.3*, por lo que se hizo un cambio de escala utilizando una distancia bien conocida: H6(C3)...H5(C3). Para analizar el comportamiento de las intensidades calculadas respecto a las distancias obtenidas para algunas de las conformaciones del *Octámero*, se construyeron las dependencias que se muestran en las *gráficas 5.5* y *5.6*. Se eligieron solo las distancias H1...H4' de A2, C3, G6, T7 y C8, y H8(H6)...H3' de G6, T5, T7 y C8, por tener picos con una buena separación (ver *tabla 5.3*). Las dependencias mostradas en las *gráficas 5.5* y *5.6* son para las intensidades calculadas para los *tiempos de mezcla* de 50 y 100 ms. Las líneas en cada una de estas *gráficas* representan las intensidades experimentales de la *tabla 5.3*.

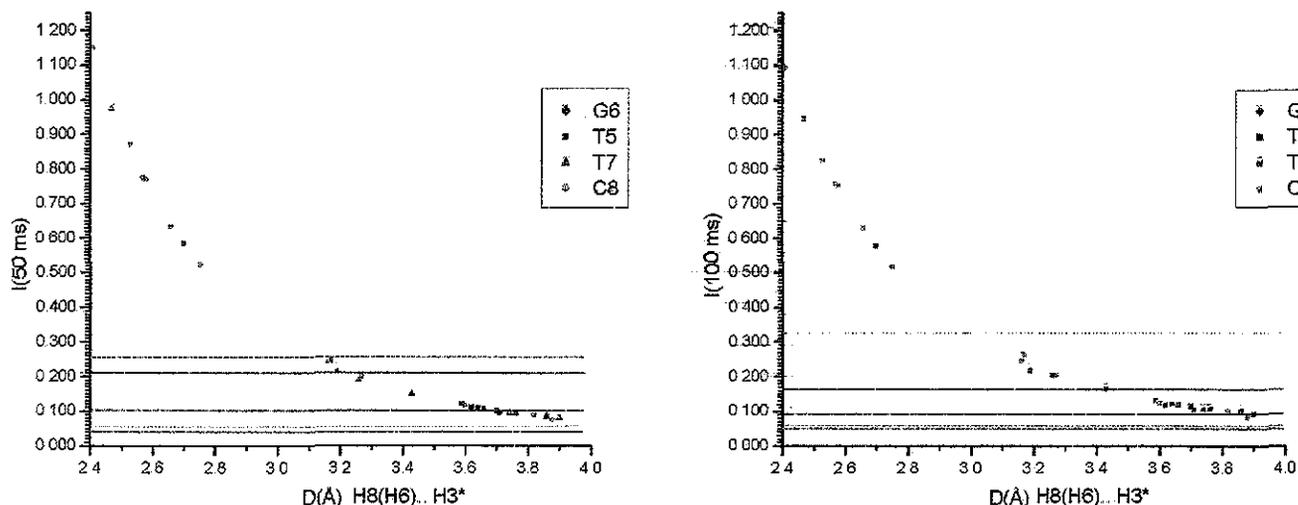
Como podemos observar el comportamiento en cada una de estas *gráficas* es similar, a distancias pequeñas le corresponden intensidades grandes y viceversa. Para la intensidad calculada para el

<sup>8</sup>En el Capítulo 4, sección 4.3 se definieron cada uno de estos tiempos.

tiempo de mezcla de 150 y 200 ms, el comportamiento es similar a de los otros *tiempos de mezcla*. Las dependencias de las *gráficas 5.5 y 5.6* serán utilizadas en la *sección 5.5* para el ajuste de las conformaciones obtenidas para el *Octámero*, principalmente se harán ajustes en las pirimidinas T7 y C8.



Gráfica 5.5 Dependencia de las intensidades calculadas para los tiempos de mezcla de 50 y 100 ms con respecto a la distancia  $H1'...H4'$  para A2, G6, T7 y C8. Las líneas representan las intensidades experimentales de la tabla 5.3.



Gráfica 5.6 Dependencia de las intensidades calculadas para los tiempos de mezcla de 50 y 100 ms con respecto a la distancia  $H8(H6)...H3'$  para G6, T5, T7 y C8. Las líneas representan las intensidades experimentales de la tabla 5.3.



## 5.5. Ajuste de las estructuras del *Octámero* a los datos *NOE* experimentales.

En general las conformaciones que se obtuvieron para el *Octámero* no corresponden completamente a los datos *NOE* experimentales. Para hacer coincidir los datos experimentales de la *tabla 5.3* con las intensidades calculadas con el programa *BIRDERR*, fue necesario imponer restricciones en algunas distancias.

El ajuste de las conformaciones no fue tratado de manera que las intensidades *NOE* calculadas correspondieran a las experimentales para todos los tiempos de mezcla, solo para el tiempo de 50 ms. Los valores de tiempos de mezcla grandes están influenciados por efectos como el de la difusión del espín (descrito en el Capítulo 4, sección 4.3). No obstante, se debe mencionar que para las conformaciones finales con picos confiables, las intensidades calculadas cambiaron con el tiempo de mezcla en la misma dirección que los datos experimentales. Este no fue el caso para todas las conformaciones de baja energía.

El ajuste de las conformaciones consistió en la comparación de las intensidades *NOE* calculadas con las intensidades *NOE* experimentales. Sabemos que las intensidades están relacionadas con la distancia interprotónica  $r$  y que es inversamente proporcional a  $r^6$ , por lo que, intensidades grandes nos indicaran que tenemos distancias interprotónicas pequeñas y viceversa. Entonces, si las intensidades calculadas son pequeñas (grandes) comparadas con las experimentales, se harán ajustes en las distancias interprotónicas para hacerlas más grandes (pequeñas).

El ajuste de las estructuras del *Octámero* a los datos *NOE* experimentales se realizó siguiendo dos pasos. Durante el primero, se ajustaron los parámetros de conformación de los nucleósidos, esto es, las distancias mencionadas en la sección 5.2 para los datos *NOE*, iniciando con la conformación denominada 0, cuyas intensidades *NOE* calculadas para algunos pares de protones, son más cercanas a las experimentales (*tabla 5.3*). Unos pocos pasos del refinamiento correspondieron a las conformaciones  $g$ ,  $h$ ,  $j$  y  $k$ . Durante este paso las conformaciones de las unidades de azúcar de los nucleósidos  $C3$  y  $T4$  se fijaron (al fijar dos ángulos de torsión), así como los valores calculados de las intensidades *NOE* para estos nucleósidos. Se impusieron restricciones sobre las distancias  $H1' (T7)...H4' (T7)$ ,  $H1' (C8)...H4' (C8)$ ,  $H6 (T7)...H3' (T7)$  y  $H6 (C8)...H3' (C8)$  (esto es, la distancia entre los  $H1'$  y  $H4'$  de la misma unidad de azúcar, y la distancia entre  $H3'$  de la unidad de azúcar y el  $H6$  de la pirimidina en un nucleótido de la misma cadena) (*tabla 5.4*), para cambiarlas a los valores correspondientes a las intensidades de la *tabla 5.3*. Como resultado se obtuvo la conformación denominada  $g$ .

Las intensidades de los picos *NOE* entre las bases es muy pequeña (*tabla 5.3*) y solo algunos de los

picos son confiables. Por lo que, solo se ajustaron durante el segundo paso algunas de las distancias inter-nucleotídicas para forzarlas a estar cercanas a los valores correspondientes a los datos *NOE* experimentales (tabla 5.3). También se debe mencionar que no hay picos entre nucleótidos de diferentes cadenas y que las intensidades calculadas no difieren de las experimentales para las conformaciones finales que se obtuvieron. Las distancias restringidas en este segundo paso fueron  $H1' (A2)...H6 (C3)$ ,  $H1' (G6)...H6 (T7)$  y  $H1' (T7)...H6 (C8)$  (tabla 5.5), esto es, las distancias entre el  $H1'$  de la unidades de azúcar de un nucleótido y el  $H6$  de las siguientes pirimidinas en la misma cadena. Las distancias inter-nucleotídicas que fueron ajustadas para reproducir los datos *NOE* en el primer paso también fueron restringidas durante el segundo y se agregaron las distancias  $H6 (T7)...H21'/H22' (T7)$  (tabla 5.5).

Después de algunas minimizaciones, con restricciones de las distancias inter-nucleotídicas y comparando las intensidades calculadas con las experimentales, se obtuvo la conformación denominada *kb* (fig. 5.4). La conformación es una conformación *B* típica, con valores medios de  $H$  y  $\tau$  de 3.3Å y 36.6°, respectivamente (datos detallados se presentan en la tabla 5.6). La conformación tiene sus unidades de azúcar en la forma  $C2' - endo$  para todas sus purinas y también para las pirimidinas  $C6$  y  $T4$ , las otras pirimidinas  $T2$  y  $C1$  tienen sus unidades de azúcar en la forma  $O4' - endo$  y  $C3' - endo$ , respectivamente. Esta conformación se considera como la final y la más cercana a los datos *NOE* experimentales.

Tabla 5.4

Distancias de los intra-nucleósidos que fueron restringidas para ajustar las conformaciones del Octámero a los datos *NOE* experimentales. Las distancias de las conformaciones inicial y final están dadas en Å.

	Distancia	Conformación inicial	Conformación final
1	$H1' (T7)... H4' (T7)$	2.55	2.88
2	$H6 (T7) ... H3' (T7)$	3.90	3.19
3	$H6 (C8)... H3' (C8)$	3.82	3.27
4	$H1' (C8)... H4' (C8)$	2.68	3.20

Tabla 5.5

Distancias de los intra-nucleósidos e inter-nucleótidos que fueron restringidas para ajustar las conformaciones del Octámero a los datos NOE experimentales. Las distancias de las conformaciones inicial y final están dadas en Å.

	Distancia	Conformación inicial	Conformación final
1	H1' (T7)... H4' (T7)	2.88	2.80
2	H6 (T7) ... H3' (T7)	3.19	3.40
3	H6 (C8)... H3' (C8)	3.27	3.15
4	H1' (C8)... H4' (C8)	3.20	3.22
5	H6 (T7)... H21'(T7)	3.74	3.11
6	H6 (T7)... H22'(T7)	4.57	4.33
7	H1' (A2)... H6 (C3)	3.08	3.36
8	H1' (G6)... H6 (T7)	2.70	3.39
9	H1' (T7)... H6 (C8)	5.03	4.12

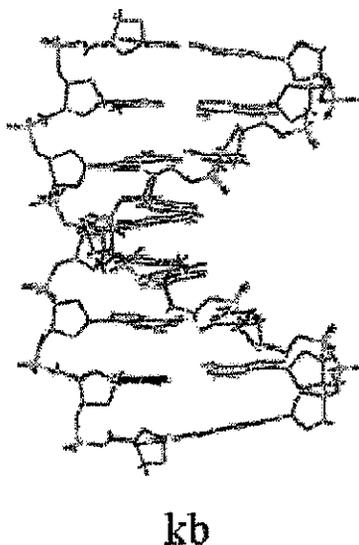
Tabla 5.6

Principales parámetros de conformación para la estructura denominada kb. Los ángulos  $\Omega$ ,  $\tau$ ,  $\kappa$ ,  $\rho$ ,  $\pi$ , la fase y el ángulo glicosídico  $\chi$  están dados en grados. Los desplazamientos DX y DY, así como la distancia entre pares de bases adyacentes H, se dan en Å y la energía E en kcal/mol. Los valores de H y  $\Omega$  corresponden a pares de bases adyacentes. La primera (segunda) columna de la fase y de  $\chi_I$  ( $\chi_D$ ) corresponden a valores de la hélice A (B).

<i>kb</i> E = -145.8												
HELIX	H	$\Omega$	$\tau$	$\kappa$	$\rho$	$\pi$	DX	DY	FASE		$\chi_I$	$\chi_D$
! C:G !	3.7	37.6	-0.2	1.7	15.1	-2.5	1	0.1	57.5	175	99	122.6
! T:A !	3.2	32.2	1.4	5.3	2.6	4	1.1	-0.3	75.9	172.9	98.5	128.6
! G:C !	3.2	40.8	1.9	6.6	-2.2	3.9	0.8	0.1	142.4	137.3	126.3	125.5
! T:A !	3.3	33.5	1.9	2.8	0.2	7.5	1.3	-0.1	137.8	162.2	126.7	130.1
! A:T !	3.2	40.8	1.9	-2.8	-0.2	7.5	1.3	0.1	162.2	137.8	130.1	126.7
! C:G !	3.2	32.2	1.9	-6.6	1.6	3.9	0.8	-0.1	137.3	142.4	125.5	126.3
! A:T !	3.7	37.6	1.4	-5.3	-2.5	4	1.1	0.3	172.9	75.9	128.6	98.5
! G:C !			-0.2	-1.7	-15.2	-2.5	1	-0.1	175	57.5	122.6	99

En la *tabla 5.7* se muestran las intensidades *NOE* calculadas para el tiempo de mezcla de 50 ms y sus correspondientes intensidades *NOE* experimentales. La desviación promedio de las intensidades calculadas de las experimentales para la conformación *kb* es del 11%. Algunas de las intensidades no fueron ajustadas exactamente, como por ejemplo, para el pico del intranucleósido H8(G1)...H1(G1), la intensidad de este pico corresponde a la unidad de azúcar en la forma C2'-endo y todas las conformaciones tienen para este pico (ver *tabla 5.7*), casi las mismas intensidades.

Seguramente, después de algunos pasos adicionales y quizá algunas otras restricciones, se podrían mejorar los resultados de la *tabla 5.7*. Esto no fue considerado debido a la exactitud limitada de los datos experimentales. La principal fuente de desviación de las intensidades *NOE* calculadas con las experimentales, es la existencia en solución de varias conformaciones con diferentes parámetros de conformación, y, por lo tanto, distancias interprotónicas (e intensidades *NOE*) algo diferentes.



**Figura 5.4** *Conformación kb*, en la *tabla 5.6* se encuentran sus principales parámetros de conformación.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla 5.7

Intensidades NOE calculadas para el tiempo de mezcla de 50 ms y su correspondientes intensidades NOE experimentales para los pares de protones con picos bien separados.

Pares de protones		NOE exp.	Intensidades calculadas									
			50 ms	d	f	l	a	b	o	g	h	k
H1' A2	H4' A2	0.187	0.254	0.271	0.282	0.287	0.312	0.328	0.171	0.167	0.168	0.160
H1' G6	H4' G6	0.237	0.299	0.156	0.344	0.148	0.149	0.181	0.159	0.271	0.280	0.236
H1' T7	H4' T7	0.493	0.376	0.347	0.319	0.377	0.327	0.862	0.441	0.503	0.501	0.504
H1' C8	H4' C8	0.203	0.267	0.370	0.308	0.255	0.318	0.640	0.225	0.225	0.242	0.220
H8 G1	H1' G1	0.105	0.054	0.052	0.055	0.060	0.053	0.056	0.061	0.065	0.062	0.058
H6 T5	H1' T5	0.072	0.100	0.101	0.093	0.096	0.096	0.095	0.103	0.099	0.098	0.102
H6 T7	H1' T7	0.113	0.101	0.103	0.102	0.101	0.102	0.097	0.116	0.096	0.094	0.096
H6 C8	H1' C8	0.090	0.101	0.097	0.093	0.101	0.092	0.098	0.097	0.094	0.097	0.098
H6 T5	H21' T5	1.782	1.870	1.907	0.842	0.201	1.528	0.334	2.235	1.716	1.629	2.106
H8 G6	H3' G6	0.043	0.056	0.063	0.052	0.076	0.060	0.068	0.065	0.062	0.058	0.057
H6 T5	H3' T5	0.101	0.099	0.092	0.078	0.583	0.079	0.106	0.101	0.092	0.090	0.108
H6 C8	H3' C8	0.259	0.775	0.039	0.067	1.150	0.066	0.090	0.201	0.246	0.242	0.249
H6 T5	H1' A4	0.161	0.163	0.179	0.187	0.262	0.224	0.202	0.148	0.194	0.199	0.162
H6 T7	H1' G6	0.120	0.147	0.219	0.147	0.331	0.212	0.200	0.562	0.189	0.159	0.138
H6 C8	H1' T7	0.113	0.306	0.382	0.290	0.033	0.263	0.100	0.036	0.036	0.114	0.104

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# Conclusiones

1. Un estudio combinado se realiza para la estructura espacial de un *octa-nucleótido* (*Octámero*): d(CTGTACAG)-d(GACATGTC).
2. Utilizando el programa CONAN (CONformational ANalysis of nucleic acids) se encontró un conjunto de conformaciones de baja energía para el *Octámero*. Estas conformaciones difieren principalmente en las unidades de azúcar de los nucleótidos con pirimidinas, en sus parámetros helicoidales y en los ángulos tilt de sus pares de bases. Un análisis de las distancias interprotónicas para varias conformaciones de baja energía, permitió elegir las diferencias más importantes en las distancias, características de las conformaciones de la doble hélice. Se construyeron las dependencias de las distancias interprotónicas sobre los parámetros de conformación de los nucleósidos.
3. Se realizó un análisis de las intensidades *NOE* del *Octámero* y se seleccionaron los picos más importantes y confiables. Estos picos caracterizan a los plegamientos de unidad de azúcar, a la conformación de los nucleósidos y al arreglo de las bases en la misma cadena.
4. Utilizando el programa *BIRDER* se realizaron cálculos teóricos de las intensidades *NOE* para un conjunto de conformaciones de baja energía del *Octámero*. Las intensidades teóricas fueron comparadas con las experimentales, y se eligieron las conformaciones con valores más cercanos a las intensidades de los picos.
5. Al imponer restricciones sobre las distancias interprotónicas, se realizó el ajuste de las conformaciones a los datos *NOE* experimentales. El ajuste incluyó dos pasos: (1) ajuste de las distancias inter-nucleotídicas, (2) ajuste de las distancias intra-nucleotídicas.
6. Se sugiere la estructura del *Octámero* más cercana a los datos experimentales.

# Referencias

- [1] Dickerson R. E. *Methods in Enzymology*. **211**, 67 (1992).
- [2] Dickerson R. E., Goodsell D.S., Kopka M. L., Pjura P. E. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **5**, 557 (1987).
- [3] Koucha K. M., Bodepudi V., Shibutana S., Eisenberg M., Jhonson F., Grollman A. P., Pate D. *J. Biochemistry*. **30**, 1403 (1991).
- [4] Chuprina V. P., Lipanov A. A., Federoff O., Yu., Kim S., Kintanar A., Reid B. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**, 9087 (1991).
- [5] Travers A.A. *Ann. Rev. Biochem.* **58**, 427 (1989).
- [6] Wemmer D. E. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **1**, 452 (1991).
- [7] Lefevre J. F., Lane A. N., Jardetzky O. *Biochemistry*. **26**, 5076 (1987).
- [8] Gorenstein D. G., Schrueler S. A., Fu J. M., Metz J. T., Roongta V. A., Jones C. R. *Biochemistry*. **27**, 7223 (1988).
- [9] Rinkel L. J., van der Marel G. A., van Boom J. H., Altona C. *Eur. J. Biochem.* **163**, 275 (1987).
- [10] Stolarski R., Egan W., James T. L. *Biochemistry*. **31**, 7027 (1992).
- [11] O'Handley S. F., Sanford D. G., Xu R., Lester C. C., Higerty B.E., Broyde S., Krugh T.R. *Biochemistry*. **32**, 2481 (1993).
- [12] Cheng J. W., Chou S. H., Reid B. R. *J. Mol. Biol.* **28**, 1037 (1992).
- [13] Ebel S., Brown T., Lane A. N. *Eur. J. Biochem.* **220**, 1037 (1992).
- [14] Omichinski U. G., Clore G. M., Shaad O., Felsenfeld G., Trainor C., Appella E., Stahl S. J., Gronenborn A. M. *Science* **261**, 438 (1993).
- [15] Billeter M., Qian V. Q., Otting G., Müller M., Gehring W., Wüthrich K. *J. Mol. Biol.* **234**, 1084 (1993).

- [16]Skenar V., Torchia D., Bax A. *J. Magn. Reson.* **73**, 375 (1987).
- [17]Skenar V. Bax A. *J. Am. Chem. Soc* **109**, 7525 (1987).
- [18]James T. L. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1**, 1042 (1991).
- [19]Weisz K. , Shafer R. H., Egan W., James T. L. *Biochemistry.* **33**, 354 (1994).
- [20]James T. L. *Methods in Enzymology.* **239**, 416 (1994).
- [21]Khutorskii V. E., Poltev V. I. *Nature.***264**, 483 (1976).
- [22] Ulyanov N. B., Lames T. L. *Methods in Enzymology.* **261**, 90 (1995).
- [23]Zhu L., Ried R. *J. Magn Reson.* **106**, 227 (1995).
- [24]Nesterova E. N., Fedorov O. Y., Poltev V. I., Chuprina V. P. *J. Biomol. Struct. Dyn.***14**, 459 (1997).
- [25]Watson J. D., Crick F. H. C. *Nature.* **171**, 737 (1953).
- [26]Volkenstein V. B. *Biofísica.* Mir Moscú, 1985.
- [27]Wilbraham A. C., Matta M. S. *Introducción a la Química Orgánica y Biológica.* Addison-Wesley, 1989.
- [28]Tepelukhin A. V., Poltev V. I., Chuprina V. P. *Biological and Artificial Intelligence Systems.* Edit. E Clementi y S. Chin. ESCOM, Leiden, 1988.
- [29]Poltev V. I., Bruskov V. I., Shulyupina N. V., Rein R., Shibata M., Orniser R. L., Miller. *J. Molecular Biology*, **27**, 447-462 (1993).
- [30]Blackburn G. M., Gait M.J. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology.* Oxford University Press, 1996.
- [31]Santamaría R., Quiroz-gutierrez A., Juarez C. *J. Mol. Struct.* **357**, 161 (1995).
- [32]Calladine C. R., Drew H. R. *Undesrtanding DNA.* Academic Prees, 1997.
- [33]Saenger W. *Principles of Nucleic Acids Structure.* Spring Verlag, New York, 1983.

- [34]Altona C., Sundaralingam M. J. *J Amer. Chem. Soc.* **94**, 8205-8212 (1972).
- [35]Hill T. L. *J. Chem. Phys.* **14**, 465 (1946).
- [36]Dostrovsky I., Hughes E. D., Ingold C. K. *J. Chem. Soc.* 173 (1946).
- [37]Westherner F.H., Mayer J. E. *J. Chem. Phys.* **14**, 733 (1946).
- [38]Burkert U., Allinger N. L. *Molecular Mechanics*. Academic Chemical Society, Washington D. C., 1982.
- [39]Domenicano A., Hargittai I. *Accurate Molecular Structures*. Oxford University Press, 1992.
- [40]Poltev V. I. Grokhlina T. I., Malenkov G. G. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2**, 413 (1984).
- [41]Beveridge D. L., Lavery R. *Theoretical Biochemistry and Molecular Biophysics*. Adenine Press, 1990.
- [42]Levine I.N. *Quantum Chemistry*. Prentice Hall, 1999.
- [43]Zhurkin V. B. Poltev V. I., Florentev V. L. *J. Molecular Biology*. **14**, 11166 (1980).
- [44]Lavery R., Zakrzewska K., Sklenar H. *Computer Physics Communications*. **91**, 135 (1995).
- [45]Go N., Sheraga H. A. *Macromolecules*. **3**, 178 (1970).
- [46]Lugovskov A. A., Dashevskiy V. G. *Zh Struct Khim.* (Moscow). **13**, 122 (1972).
- [47]Poltev V. I., Shulyupina N. V. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **3**, 739 (1986).
- [48]Poltev V. I. *Sov. Phys Crystallogr.* **272**, 259-262 (1977).
- [49]Poltev V. I. *Int. J. Quantum Chem.* **16**, 863 (1979).
- [50]Solomon I. *Phys. Rev.* **99**, 559 (1955).
- [51]Nerdal W., Hare D. R., Ried B. R. *Biochemistry*. **28**, 1008 (1989).
- [52]Banks K. M., Hare D. R., Ried B. R. *Biochemistry*. **28**, 6996 (1989).
- [53]Boelens R., Koning T. M. G., van der Marel, van Boom J. H., Kaptein R. *J. Magn. Reson.* **82**, 290 (1989).

- [54]Borgias B. A., James T. L. *J. Magn Reson.* **79**, 493 (1988).
- [55]Borgias B. A., James T. L. *J. Magn Reson.* **87**, 475 (1990).
- [56]Post C. B., Meadows R. P., Gorenstein D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 6796 (1990).
- [57]Jeener J., Meier B. H., Bachmann P., Ernest R. R. *J. Chem. Phys.* **71**, 4546 (1979).
- [58]Ernest R. R., Bodenhauser G., Wokau A. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions.* Clarendon Press, Oxford (1990).
- [59]Wüthrich K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids.* New York, Wiley, 1986.
- [60]van de Ven F. J. M., Hilbers C. W. *J. Biochem.* **178**, 1 (1988).
- [61]Wijmenja S. S., Mooren M. M., Hilbers C. W. *NMR of Nucleic Acids. NMR of Macromolecules.* ed G. C. K. Roberts, Oxford: IRL Press, 1993.
- [62]Wang A. C., Kim S. G., Flynn P. F., Chou S. H., Orban J., Ried R. *Biochemistry.* **31**, 3940 (1992).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALI  
DE LA BIBLIOTECA