



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Facultad de Química

**“Asignación de señales de ^1H , ^{13}C y ^{15}N
de la proteína 6aJL2 en espectros
multidimensionales de Resonancia
Magnética Nuclear.”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Q U Í M I C A
P R E S E N T A

Adriana Licona García



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.

Este trabajo fue posible gracias al apoyo del proyecto PAPIIT/IN-213807 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, DGAPA.

A Jesús
por el ejemplo,
las coincidencias y la vida.

A Ricardo,
por el tiempo compartido

A mi querida familia Vero, Ester y Tomás,
por permanecer, y a los que también son parte: Martha y José.

Agradezco a todos los que participaron en la realización de este trabajo::

Baltazar Becerril y Luis del Pozo Yauner del Instituto de Biotecnología , UNAM

Atilano Gutiérrez del Laboratorio Central, UAM

Carlos Amezcua del Medical Center, Universidad de Texas

Agradezco de manera muy especial a Fede por el apoyo, la amistad,
las enseñanzas y las experiencias compartidas.

A todos aquellos que aportaron más que conocimientos
a este proyecto: Rogelio, Amed, Ernesto y a toda la familia del Laboratorio de Bioquímica I;
Dr. Barrios, Chelo, Alma, Angélica, Enrique y Belén.

“Art is the necessary consequence of science”

Bacon

Índice

Introducción	4
Objetivos	6
Fundamentos Teóricos	7
Desarrollo Experimental	25
Análisis de Resultados	36
Conclusiones	42
Anexo I. Patrón de señales TOCSY para cada Sistema de Espín	43
Anexo II. Estructura de los 20 aminoácidos comunes	44
Anexo III. Tabla de Desplazamientos Químicos de 6aJL2	45
Apéndice A. Conceptos Básicos	50
Apéndice B. Manejo del Programa nmrPipe	58
Apéndice C. Interpretación de Espectros 3D	68
Referencias	71

Tabla de Símbolos

pI	Punto Isoeléctrico
k_B	Constante de Boltzmann $1.3805 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$
h	Constante de Planck $4.135\ 667\ 43 \times 10^{-15} \text{ eV s}$
B₀	Campo magnético aplicado
B₁, B₂, B₃ ...	Campo magnético asociado a una radiofrecuencia
rf	Radiofrecuencia
I	Número Cuántico de Espín Nuclear
Hz	Hertz
S	Momento angular de espín
m	Número cuántico direccional
Da	Dalton $\text{Da} = 1\text{g/mol}$
v	Frecuencia
v₀	Frecuencia de Larmor
γ	Constante giromagnética
μ	Momento magnético
ΔE	Diferencia de energía
ⁿJ_{AX}	Constante de acoplamiento de los núcleos AX, a n enlaces de distancia
¹H^N	Protón unido a ¹⁵ N
¹H_α	Protón alfa
¹³C_α	Carbono alfa
¹³C_β	Carbono beta
¹⁵N^H	Nitrógeno unido a ¹ H

Introducción

A partir de 1957, año en que se reporta el primer espectro donde se observan señales debidas a un biopolímero (Saunders 1957), la RMN ha sido pieza clave en la investigación del funcionamiento de los sistemas vivos. En 1982 se realiza la primera asignación de átomos de ^1H de un biopolímero (Wagner, 1982) y en 1984 se publica la primera estructura tridimensional determinada por esta técnica (Wuthrich 1984).

La posibilidad de enriquecer a los biopolímeros con isótopos activos en RMN, ^{15}N y ^{13}C , el uso de campos magnéticos más intensos, mayor capacidad de cómputo, entre otros avances; permitió el desarrollo de la RMN multidimensional y heteronuclear¹. Con ello se incrementó el tamaño de los biopolímeros con los que se trabaja hasta 900kDa.² Hoy en día no sólo se obtienen estructuras tridimensionales; también se realizan estudios de cinética, dinámica y termodinámica de las interacciones entre biopolímeros, monitoreo de cambio conformacional, entre otros.³

El tema que nos atañe es la amiloidosis por cadenas ligeras de inmunoglobulinas (AL), que es una patología causada por errores de plegamiento de cadenas ligeras, esto provoca la formación irreversible de agregados fibrilares insolubles llamados amiloides.⁴

Las cadenas ligeras son una de las dos subunidades de la estructura básica de los anticuerpos. La otra son las cadenas pesadas. Las cadenas ligeras poseen dos dominios, el dominio variable (V_L) y el dominio constante (C_L).⁵ La secuencia de V_L es muy variable, ello debido a procesos de recombinación génica y de mutaciones somáticas. La variabilidad se concentra especialmente en las regiones determinantes de complementariedad, CDRs.

La AL es una “enfermedad conformacional”, generalmente causada por la agregación amiloide de un fragmento de cadena ligera, que comprende solamente el dominio variable (V_L), o éste y una pequeña porción del dominio constante, C_L . El uso de

¹ Wutrich, 1990

² Keeler, 2005

³ Wutrich, Nobel Lecture, 2002

⁴ M. Cháñez-Cárdenas, 2002

⁵ *Idem*

mutagénesis sitio dirigida, ha permitido demostrar que cambios en ciertas posiciones de la secuencia, que parecen ser críticas para la estabilidad de V_L , favorecen su agregación.⁶

Para monitorear la estabilidad de V_L , se realizó la asignación de 1H , ^{13}C y ^{15}N de 6aJL2, un dominio variable recombinante, derivado de los conjuntos de genes 6a y JL2. Este se compone de 111 aminoácidos, tiene un peso molecular de 11.952kDa y el pI que presenta es de 5.1. Los resultados se compararon con los datos reportados de 6aJL2(R25G) (Gutiérrez-González, 2007), que es el mismo dominio variable 6aJL2, con una mutación en R24 (R25G).

El Objetivo, el Desarrollo Experimental, el Análisis de Resultados y las Conclusiones; integran por sí mismos la totalidad de este trabajo. Sin embargo es necesario un panorama general de la técnica que se utilizó para el óptimo seguimiento de éstos, ello se resume en los Fundamentos Teóricos.

En el Apéndice A se incluye la definición de algunos Conceptos Básicos que son indispensables para el desarrollo del capítulo Fundamentos Teóricos. En el Apéndice B se describe el contenido de los textos de procesamiento que se utilizan para manipular los FID's en el programa nmrPipe, y en el Apéndice C están las instrucciones básicas para la interpretación de experimentos 2D y 3D en el programa CARRA 1.8 (Wüthrich, 2007).

Así, este trabajo pretende ser una primera referencia para la interpretación de espectros 3D.

⁶ M. Cháñez-Cárdenas, 2002

Objetivos

- Obtener los siguientes espectros:
 - ^{15}N HSQC,
 - ^{13}C HSQC,
 - HCCH TOCSY,
 - ^{15}N TOCSY HSQC y ^{15}N NOESY HSQC,
 - HNCA y HNCOCA
 - HNCACB y CBCACONH
 - HNCO y HNCACO.
- Sistematizar la manipulación de los experimentos, mediante la creación y optimización de textos de procesamiento en el programa nmrPipe.
- Asignar las señales de ^1H , ^{13}C y ^{15}N de los 111 aminoácidos, sistemas de espín, que conforman la secuencia de 6aJL2.
- Comparar la estimación de la estructura secundaria, obtenida mediante un análisis estadístico en el programa CSI (Wishart, 1994), con la estructura tridimensional de 6aJL2(P7S) obtenida por Difracción de Rayos X (Dra. Rodríguez. Comunicación Directa).
- Comparar los desplazamientos químicos de 6aJL2 con los que presenta 6aJL2(R25G) (Gutiérrez-González, 2007).
- Determinar qué residuos están involucrados en el fenómeno de fibrilación de 6aJL2(R25G).

Fundamentos Teóricos

Los núcleos poseen un momento angular de espín, S . Algunas consideraciones de la mecánica cuántica muestran que, como muchas otras cantidades atómicas, la magnitud del momento angular de espín está cuantizada¹:

$$S = \frac{h}{2\pi} \sqrt{I(I+1)}$$

Ecuación 1

donde h es la constante de Planck e I es el número cuántico del momento angular de espín, o espín nuclear. El espín nuclear es una propiedad que presentan las partículas subatómicas, cuyo valor puede ser un número positivo, entero o semientero. En el caso de los núcleos que estudiaremos (^1H , ^{13}C y ^{15}N), I es igual a $\frac{1}{2}$ (Ver Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Propiedades Nucleares de algunos Isótopos RMN activos²

Los núcleos cuyo espín nuclear es cero, no son activos en RMN. La tabla presenta algunos parámetros de tres isótopos con espín $\frac{1}{2}$ que son utilizados para experimentos con biopolímeros.

Isótopo $I = \frac{1}{2}$	$\gamma \times 10^{-7}$ (rad T ⁻¹ s ⁻¹)	ν_0 a 11.74T (MHz)	Abundancia Natural (%)	Sensibilidad	
				Relativa ^a	Absoluta ^b
^1H	26.75	500.0	99.98	1.0	1.0
^{13}C	06.73	125.7	01.11	1.6×10^{-2}	1.8×10^{-4}
^{15}N	-02.71	050.7	00.37	1.0×10^{-3}	3.8×10^{-6}

^a Sensibilidad Relativa a un campo constante para igual número de núcleos

^b Producto de sensibilidad relativa y abundancia natural

El momento angular de espín, S , está asociado con un momento magnético μ . Ambas son cantidades vectoriales y son directamente proporcionales³:

$$\mu = \gamma S$$

Ecuación 2

El factor de proporcionalidad γ es una constante que tiene un valor para cada núcleo, se le llama constante giromagnética y la sensibilidad de detección en experimentos de RMN depende de ésta. Los núcleos que poseen un valor de γ grande, se observan más fácilmente que los que poseen valores de γ menores (Ver Tabla 1.1).

Si combinamos ambas ecuaciones, se obtiene que el valor del momento magnético μ se puede expresar como:

¹ Friebolin, 1998

² Wüthrich (1986)

³ *Idem*

$$\mu = \frac{h}{2\pi} \gamma \sqrt{I(I+1)}$$

Ecuación 3

En ausencia de un campo magnético externo B_0 , a las distintas orientaciones de los vectores S se les asocia el mismo valor de energía. En un experimento de RMN, la muestra en estudio se expone a un campo magnético B_0 durante algunos segundos. Bajo la influencia de B_0 , el espín nuclear es polarizado (Ver Tabla 1.1). Esto provoca que S se oriente:

$$S_z = m \frac{h}{2\pi}$$

Ecuación 4

Donde S_z es la componente en el eje z del momento angular de espín y m es el número cuántico direccional que es igual a:

$$m = I, I-1, \dots, -I$$

Ecuación 5

Entonces existen $2(I) + 1$ valores de m y por lo tanto $2(I) + 1$ orientaciones de S_z . En este caso, donde I vale $\frac{1}{2}$, existen dos orientaciones, $m = \frac{1}{2}$ y $m = -\frac{1}{2}$. (Figura 1.1).

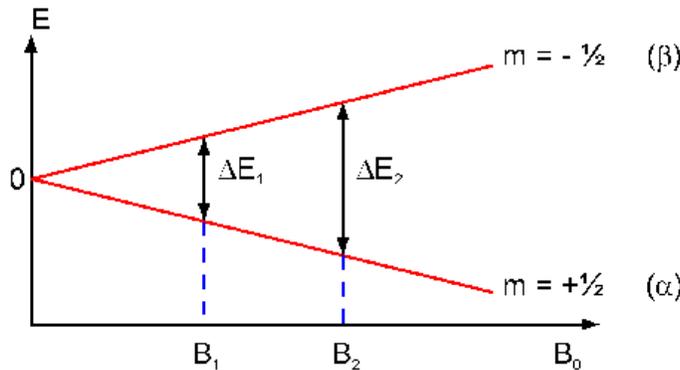


Figura 1.1 Desdoblamiento de los niveles energéticos debido a la presencia de un campo magnético externo, B_0 . La diferencia de energía, ΔE , está en función del tamaño de B_0 .

Así, algunos núcleos, un poco más de la mitad, se orientan a favor del campo ($m = +\frac{1}{2}$) y los restantes en contra de este ($m = -\frac{1}{2}$). Esta diferencia poblacional puede calcularse mediante la distribución de Boltzmann que se define en la siguiente ecuación:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{\frac{-\Delta E}{k_B T}}$$

Ecuación 6

Donde N_α es la población de espines en el estado de menor energía ($m = +\frac{1}{2}$) y N_β es la población de espines en el estado de mayor energía ($m = -\frac{1}{2}$), k_B es la constante de Boltzmann y T la temperatura absoluta. ΔE es la diferencia de energía entre el estado de mayor energía y el de menor.

Debido a que existe un mayor número de espines orientados a favor del campo magnético B_0 , se provoca una magnetización macroscópica neta, \mathbf{M} , que se orienta en dirección de B_0 .

Si combinamos las ecuaciones (1) y (4), obtenemos la componente z del momento magnético:

$$\mu_z = m\gamma \frac{h}{2\pi}$$

Ecuación 7

La energía de un dipolo magnético (espín nuclear polarizado) en un campo magnético B_0 es:

$$E = -\mu_z B_0$$

Ecuación 8

Así, la energía de los estados posibles para un núcleo con $2I + 1$ orientaciones es:

$$E = -m\gamma B_0 \frac{h}{2\pi}$$

Ecuación 9

Entonces, la diferencia de energía entre dos niveles de energía consecutivos es:

$$\Delta E = \gamma B_0 \frac{h}{2\pi}$$

Ecuación 10

Además, la absorción de energía necesaria para pasar de un nivel de menor energía a otro de mayor (ΔE), está asociado a una frecuencia:

$$h\nu_0 = \Delta E$$

Ecuación 11

entonces,

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$

Ecuación 12

a esta frecuencia se le conoce como frecuencia de resonancia o frecuencia de Larmor. La muestra, que continúa expuesta al campo magnético B_0 , es irradiada con uno o varios pulsos de radiofrecuencias (rf).

Si se aplica un pulso de rf de 90° sobre el eje x , se origina la rotación de \mathbf{M} en el plano x,y , perpendicular a B_0 . Dicha magnetización sobre el plano x,y precesa bajo la influencia del campo magnético estático B_0 en la frecuencia de resonancia (o frecuencia de Larmor) ν_0 , e induce una corriente eléctrica en una bobina de detección. Esta corriente eléctrica es la observación primaria en un experimento de RMN. En la Figura 1.2 se esquematiza un equipo de RMN y se señala con una flecha la bobina de detección.

Como el sistema tiende a regresar al estado de equilibrio termodinámico, con la magnetización paralela a B_0 ; la magnetización sobre el plano xy decae con el tiempo, a este hecho se le llama decaimiento libre de la inducción, FID (*Free Induction Decay*), y es adquirido durante un periodo de tiempo aproximado de un

segundo. Dicha secuencia se repite n veces, de tal forma que los n FID's se suman para obtener una señal considerablemente más grande que el ruido. Entonces, se aplica una transformada de Fourier a estos FID's y se logra un espectro de RMN (Figura 1.3).⁴

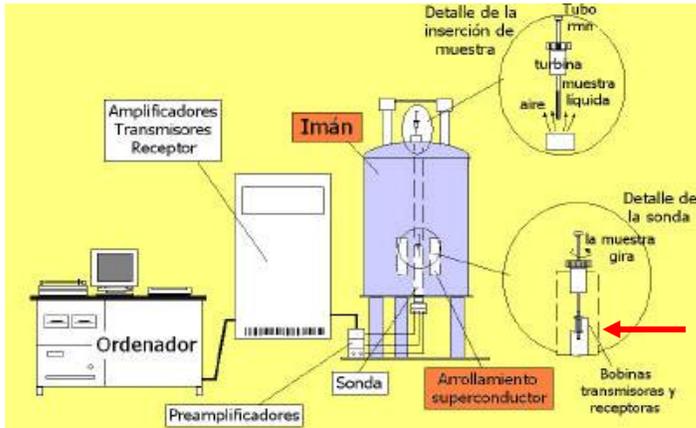


Figura 1.2. Esquema general de un Equipo de RMN. Se señalan los componentes básicos del equipo y con la flecha roja se señala la bobina de detección

Los experimentos en una dimensión, $F(t_1)$, se representan como un gráfico de la intensidad de absorción en el eje vertical contra la frecuencia en el eje horizontal⁵. Las frecuencias de absorción son diferentes para cada núcleo, aunque se trate del mismo tipo de átomo, porque dependen no sólo de las contribuciones de B_0 , sino de las que el momento magnético, μ , de núcleos vecinos puedan tener. Este fenómeno le da sentido a la RMN como una técnica de caracterización y es el fundamento del desplazamiento químico (Apéndice A. Conceptos Básicos).

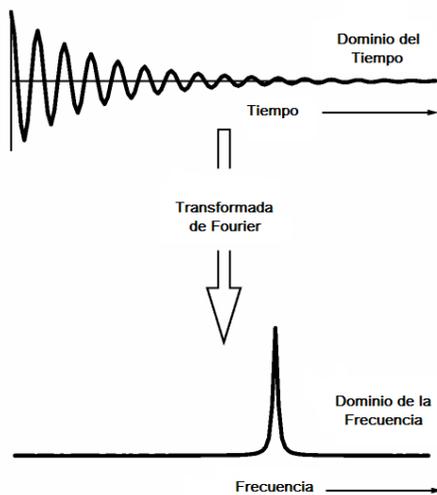


Figura 1.3. Los FID's son adquiridos en el dominio del tiempo. Posteriormente se aplica una transformada de Fourier y se obtiene una señal en el dominio de frecuencia:Error! Marcador no definido

4 Wutrich, 1998

5 Keeler, 2005

Experimentos 2D

La obtención de experimentos de RMN en dos dimensiones, 2D, se representa en el siguiente esquema general (Figura 1.4):

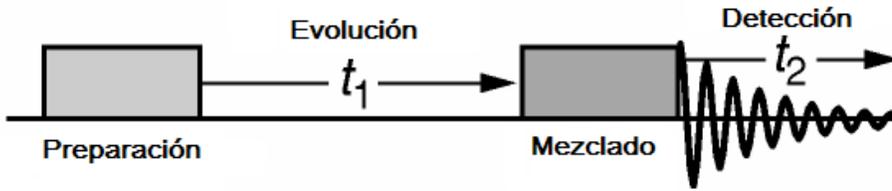


Figura 1.4. Secuencia general de pulsos para la obtención de un experimento en 2D. ¡Error!

El análisis de la obtención de éste involucra conceptos como el de *coherencia*, que definiremos por conveniencia como magnetización transversa sobre el eje xy . Esta definición se amplía en Conceptos Básicos (Apéndice A).

Describiremos el esquema anterior como sigue. El periodo de preparación es el momento en el cual M , que hasta ese momento se encuentra paralelo a B_0 , es irradiado con un pulso de 90° sobre el eje x , generando una magnetización transversa sobre el plano xy (*coherencia cuántica simple*). Este periodo suele ser una colección de pulsos y tiempos de espera un tanto más complicada. Por ejemplo, puede ser una secuencia de pulsos que genere coherencia cuántica múltiple (Apéndice A).

Durante el periodo de evolución, t_1 , no se aplica pulso de rf , tampoco es un tiempo de detección, y es incrementado sistemáticamente en una serie de experimentos separados (Figura 1.5). La coherencia presente en este periodo no es observada, sólo se “almacena” la información que se genera.

Después sigue el periodo de mezclado, durante el cual la coherencia presente al final de t_1 , es convertida en una señal observable que puede ser obtenida durante el periodo de detección, t_2 . Durante el tiempo de mezclado, la magnetización de un espín es transferida a otro espín a través, por ejemplo, de acoplamientos escalares, según sean estas transferencias; será la información contenida en el espectro. Así, el proceso de adquisición de un espectro de dos dimensiones se ilustra en la Figura 1.5.

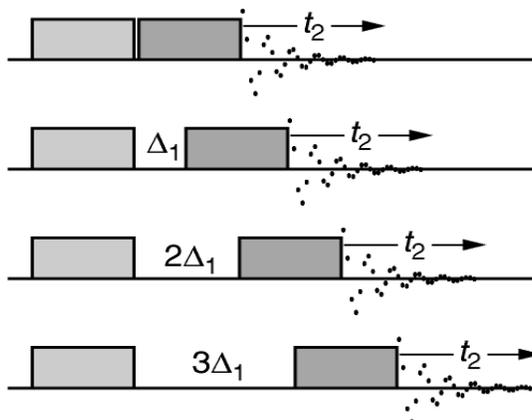


Figura 1.5. Proceso de adquisición de un espectro 2D.

Primero t_1 es cero; la secuencia de pulsos se ejecuta y el FID es grabado como una serie de puntos. Esta colección de datos se conoce como el primer incremento de t_1 . Después, t_1 es igual a Δ_1 ; una vez más la secuencia es ejecutada y los datos son almacenados en la memoria del procesador. Esta colección de datos se conoce como el segundo incremento de t_1 . El proceso es repetido con $t_1 = 2\Delta_1, t_1 = 3\Delta_1 \dots$ hasta que se obtiene un número suficiente de incrementos de t_1 . Es posible representar esta colección de puntos como una matriz; el primer renglón es el valor de t_2 para $t_1=0$, el segundo renglón es el valor de t_2 para $t_1 = \Delta_1$, el tercero para $t_1= 2\Delta_1$ y así sucesivamente. Esta colección de datos en dos dimensiones es una función en el dominio del tiempo que se expresa como $D(t_1, t_2)$.

El t_2 es almacenado en tiempo real, justo como se hace en los experimentos de una dimensión. Así, para la obtención de experimentos 2D, es necesario aplicar una transformada de Fourier en el dominio de t_1 y una segunda para el dominio de t_2 , de tal forma que la función D se transforme a una nueva función G en el dominio de las frecuencias $G(f_1, f_2)$ (Apéndice B).

Los experimentos 2D se grafican en tres dimensiones; el plano xy son las frecuencias (F_1, F_2) del par de átomos acoplados y z es la amplitud de la señal (absorción). Para que la interpretación sea más fácil, los espectros de dos dimensiones se grafican como curvas de nivel, de tal forma que los espectros sean de dos dimensiones y las señales se definan como picos de intersección (núcleos acoplados) entre ambas dimensiones. A continuación se describen los experimentos que se utilizaron en este trabajo:

¹⁵N-HSQC

El experimento ¹⁵N HSQC es un experimento de dos dimensiones utilizado para observar la correlación de los desplazamientos químicos del heteroátomo ¹⁵N y de ¹H, a un enlace de distancia, debida a un acoplamiento escalar. En la Figura 1.6 se muestra dicho espectro y se señalan las componentes de la intersección. Se observa que el desplazamiento químico de 7.5ppm en la dimensión de ¹H, es modulada por una frecuencia en 124.3ppm que corresponde al desplazamiento químico del ¹⁵N al cual está acoplado.

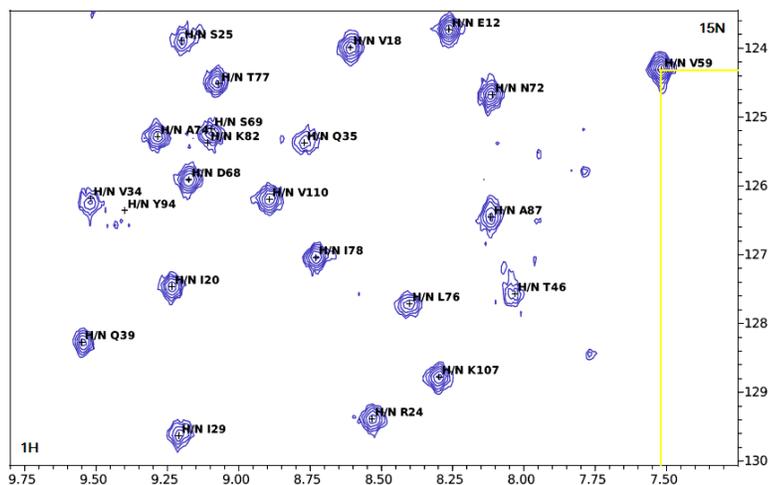


Figura 1.6. Espectro ¹⁵N HSQC en el que se señala con líneas amarillas los desplazamientos químicos de un ¹H^N y ¹⁵N que están acoplados, formando el pico de la intersección.

^{13}C -HSQC

El experimento ^{13}C HSQC es un experimento de dos dimensiones utilizado para observar la correlación de los desplazamientos químicos del heteroátomo ^{13}C y de ^1H , a un enlace de distancia, debida a un acoplamiento escalar.

En la figura 1.7 se muestra una secuencia de pulsos del experimento HSQC. En este, primero se transfiere magnetización del espín I, que es el de ^1H , al espín S, que puede ser ^{13}C ó ^{15}N , usando el mismo método que en el experimento INEPT (Apéndice A). La magnetización del espín S se desarrolla durante t_1 , tiempo en el cual se reenfoca el acoplamiento. Después, esta magnetización es transferida nuevamente al espín I. Dicha magnetización está en antifase, así que es necesario aplicar la secuencia retro-INEPT para ponerla en fase. Se dice que la magnetización está en antifase cuando se encuentra sobre el eje $-y$, y que está en fase cuando está sobre el eje y .

Finalmente se desacopla S y se observa I.

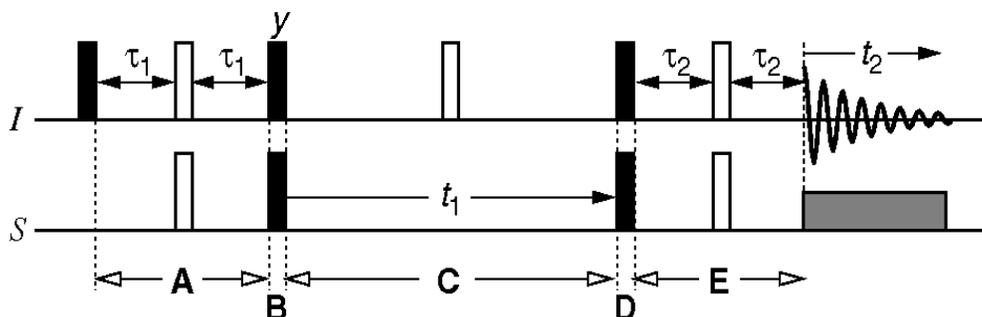


Figura 1.7. Secuencia de pulsos de una correlación heteronuclear usando el experimento HSQC. Primero se aplica un pulso de preparación sobre el espín I. La magnetización de I es transferida al espín S usando una secuencia INEPT, periodo A y B. La magnetización de S se desarrolla durante t_1 , tiempo en el cual se reenfoca el acoplamiento. Finalmente, dicha magnetización es transferida a I. Durante el periodo E, que es un eco de espín, la señal, que está en antifase, se pone en fase y entonces puede ser observada desacoplando S.

Los experimentos de dos dimensiones han demostrado ser una de las aportaciones más importantes en RMN de alta resolución. Sin embargo, para proteínas con masas moleculares mayores a 10kDa, este incremento en la resolución es insuficiente. Esta limitación se ha superado incrementando el número de dimensiones, frecuencias, para un mismo espectro. Los fundamentos que se han expuesto para explicar experimentos 2D, se extienden para espectros de n dimensiones.

Experimentos 3D

La secuencia de pulsos de un experimento de tres dimensiones, 3D, es una combinación de dos secuencias de pulsos de experimentos 2D, como se muestra en la Figura 1.8:

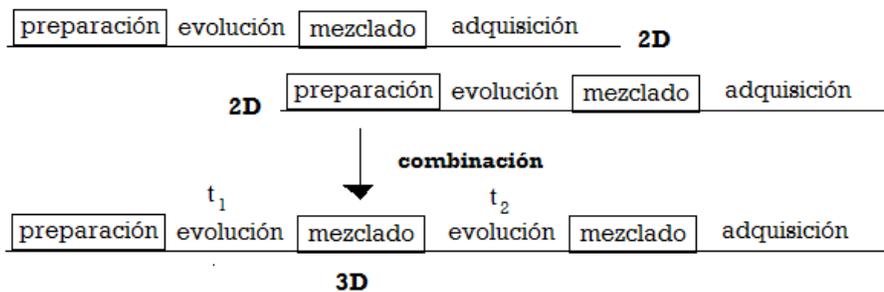


Figura 1.8. Esquema de las partes que componen la secuencia de pulsos de un espectro 3D.

En experimentos de tres dimensiones, la señal es adquirida durante un tiempo de adquisición t_3 , como función de dos tiempos de evolución, t_1 y t_2 , los cuales se incrementan independientemente. Este proceso genera una matriz de tres dimensiones en el dominio de tiempo, a la cual se le aplican tres transformadas de Fourier. Obteniendo como resultado las correspondientes dimensiones de frecuencia F_1 , F_2 y F_3 .

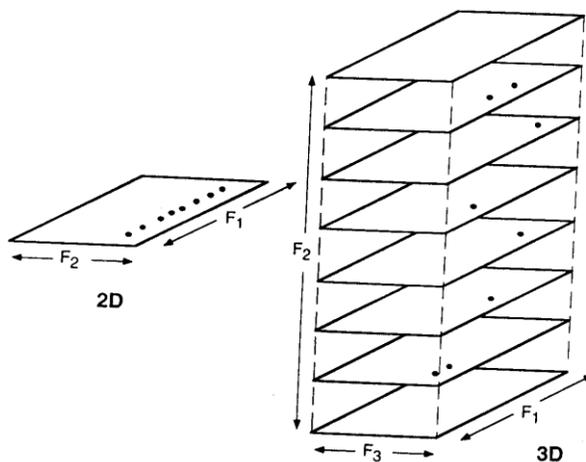


Figura 1.9. Conjunto de espectros 2D que forman un espectro en 3D.

El espectro puede ser representado como un cubo tridimensional, pero el análisis de espectros de tres dimensiones se realiza en planos de dos dimensiones extraídos del cubo, como se muestra en la figura 1.9. En este caso, los planos del cubo pueden ser observados como una colección de espectros en dos dimensiones (F_1 , F_2) separados por interacciones a través de la dimensión F_3 .

Existen dos tipos de experimentos 3D; aquellos que se forman a partir de dos experimentos 2D, y aquellos que combinan transferencias de magnetización a través de acoplamientos escalares, ó a través de acoplamientos dipolares de tres diferentes núcleos; experimentos de resonancia triple. Los tres siguientes corresponden a los que se forman a partir de experimentos 2D y los restantes al segundo caso.

^{15}N TOCSY-HSQC

El experimento ^{15}N TOCSY-HSQC es un experimento en tres dimensiones donde es posible obtener la información convencional de un espectro TOCSY, con la variante de que posee una tercera dimensión del desplazamiento químico de ^{15}N . Así, en un plano se observa la correlación $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ que corresponde a las

amidas de los enlaces peptídicos (^{15}N HSQC) y en un segundo plano se observa la correlación $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de una cadena continua de acoplamientos (TOCSY) (Figura 1.10). A continuación se describe el experimento TOCSY.

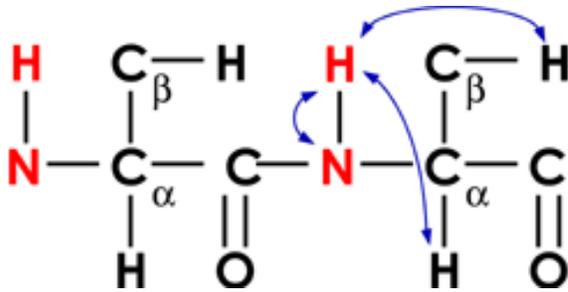


Figura 1.10. Modelo de la transferencia de magnetización de un espectro ^{15}N TOCSY HSQC.

TOCSY, por sus siglas en inglés Total Correlation Spectroscopy, es una técnica que se conoce también con el acrónimo HOHAHA (Homonuclear Hartmann-Hahn). En esta técnica se utiliza un proceso de mezclado isotrópico (Apéndice A) para transferir magnetización en fase a través de acoplamientos escalares fuertes. Como resultado de este proceso, la magnetización puede ser transferida a través de varios acoplamientos durante el periodo de mezclado. El cruce de intersección es generado por interacciones entre los protones del sistema. En la Figura 1.11 se muestra la secuencia de pulsos.

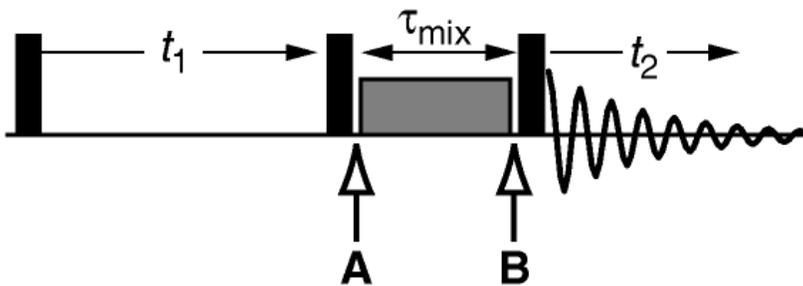


Figura 1.11. Secuencia de Pulsos del experimento TOCSY. La parte medular de esta secuencia es el periodo del mezclado isotrópico, indicado por el rectángulo de color gris, en el cual se transfiere magnetización entre espines que están conectados mediante una cadena continua de acoplamientos.

En ésta, primero se aplica un pulso de preparación que transfiere la magnetización al eje xy , dicha magnetización evoluciona en un lapso de tiempo t_1 . Entonces se aplica un segundo pulso de 90° y así se excita un tipo de protón determinado, ($^1\text{H}^N$), en este caso el protón de amida del enlace peptídico. Durante el periodo de mezclado, se aplica el “*spin lock*” (*mezclado isotrópico*), que va del punto A al B, y así la polarización es transferida, del ^1H de amida, al resto de los protones en el sistema de espín o cadena de núcleos acoplados. Por lo tanto, en el periodo de adquisición se obtienen señales de cada cadena de protones acoplados; a dicha cadena se le conoce como sistema de espín. El mecanismo del *spin lock* resulta complejo, así que sólo diremos que durante su aplicación los núcleos experimentan un campo magnético débil, B_1 , debido a una *rf*. Así que la diferencia entre desplazamientos químicos es muy pequeña y el acoplamiento escalar domina la posición de las señales. Esto resulta en una mezcla de estados de espín que permite la transferencia de polarización. Entonces, cuando un ^1H en particular es excitado selectivamente; la polarización se transfiere a todos los protones del sistema, no solamente a aquellos que presentan acoplamiento escalar directo con el ^1H inicialmente excitado.

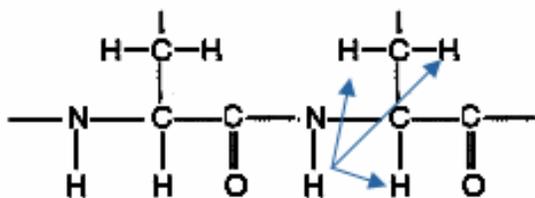


Figura 1.12. Modelo de la transferencia de magnetización de un espectro TOCSY.

^{15}N NOESY–HSQC

El experimento ^{15}N NOESY–HSQC es un experimento de tres dimensiones que, al igual que el experimento ^{15}N TOCSY–HSQC posee una tercera dimensión del desplazamiento químico de ^{15}N asociado con el $^1\text{H}^{\text{N}}$ de la amida que se está observando (HSQC). En un espectro NOESY las señales son generadas, no por transferencia de coherencia a través de acoplamientos, sino por relajación cruzada (Apéndice A). Una de las manifestaciones de esta relajación es el Efecto Nuclear Overhauser (NOE). Entonces, para nuestro estudio, una señal NOE indica relajación cruzada de dos espines, el espín A y el espín B, por lo que éstos que estar razonablemente cerca en el espacio, a menos de 5Å (Acoplamiento Dipolar).

Como en todos los espectros homonucleares; el NOESY presenta una diagonal sobre el plano ^1H , ^1H , debida a que las señales de un mismo núcleo aparecen en las dos dimensiones, como se muestra en la Figura 1.13:

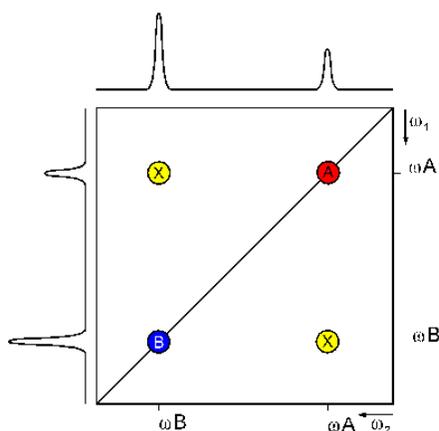


Figura 1.13. Diagrama de un espectro homonuclear donde se muestra la diagonal debida a que los núcleos A y B, se encuentran en ambas dimensiones. Las señales X son señales NOE debidas a intersecciones de relajamiento de los núcleos A y B (acoplamiento dipolar).

Entonces, en un espectro NOESY se observa:

- La diagonal (A,A).
- Picos de intersección de átomos que además están acoplados escalarmente ($A-C-B$, $^2J_{AB}$).
- Picos de intersección de átomos a menos de 5Å de distancia (acoplamiento dipolar).

Por tanto, en el experimento NOESY se pueden observar las señales del experimento TOCSY, y señales NOE, que se definen como señales debidas a acoplamientos dipolares. Esto se muestra en la Figura 1.14:

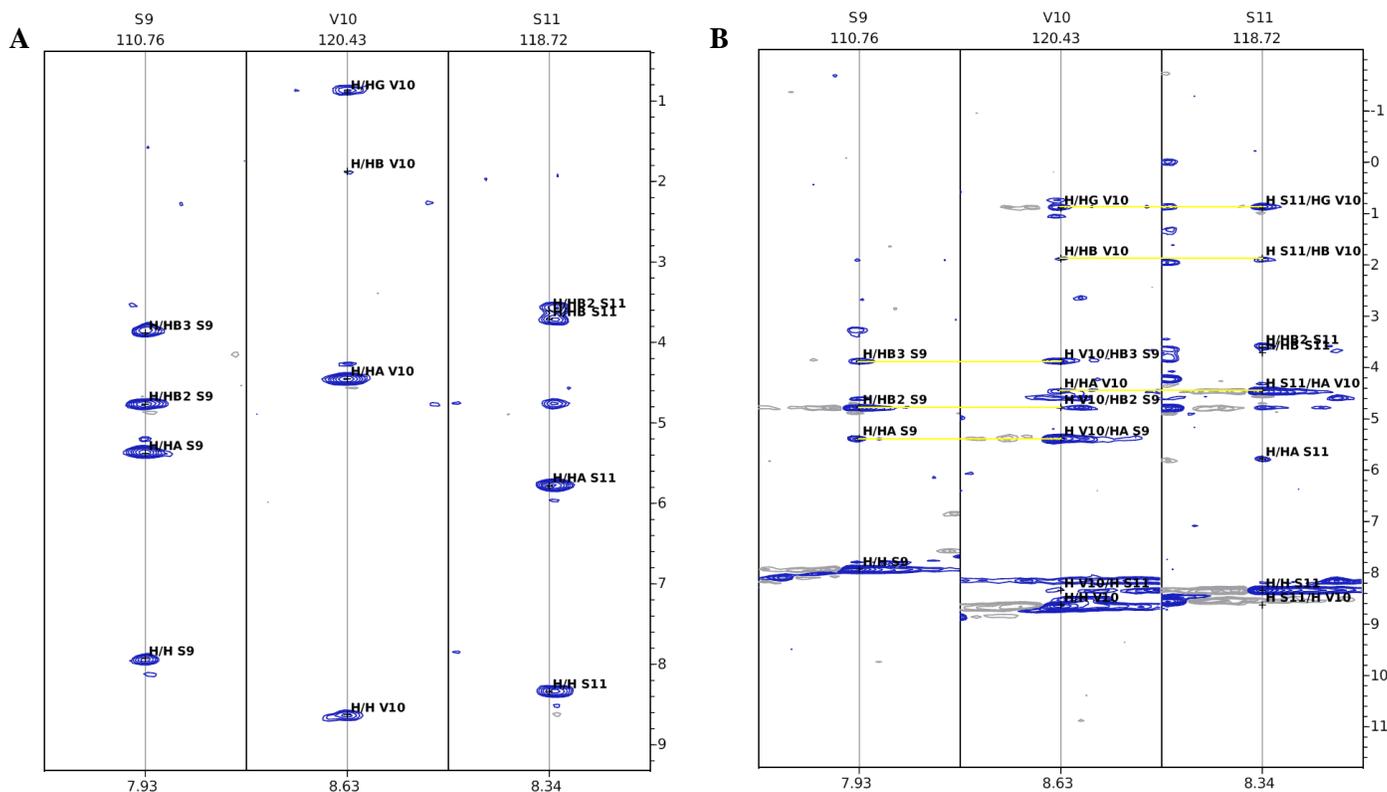


Figura 1.14. Franjas, S9-S11, del espectro ^{15}N HSQC TOCSY (A), donde se observan señales debidas a una cadena de acoplamientos. Mientras que en el espectro ^{15}N NOESY HSQC (B), además se muestran señales NOE que correlacionan con las señales del residuo anterior.

La secuencia de pulsos de un experimento NOESY de 2D se describe como sigue (Figura 1.15). Inicialmente, la magnetización se encuentra sobre z , ya que se está aplicando un campo magnético B_0 , al aplicar el pulso de 90° sobre x , la magnetización se encuentra ahora sobre el eje y . Durante el intervalo de tiempo t_1 , que es incrementado como se describió para espectros 2D, la magnetización precesa sobre el plano xy . El segundo pulso de 90° sobre x , pasa la componente de la magnetización sobre el eje y al eje z . En el tiempo de mezclado, τ , el sistema sufre una relajación y al mismo tiempo algunas componentes de la polarización son transferidas del espín A al espín B y viceversa. Este proceso se conoce como relajación cruzada o polarización cruzada.

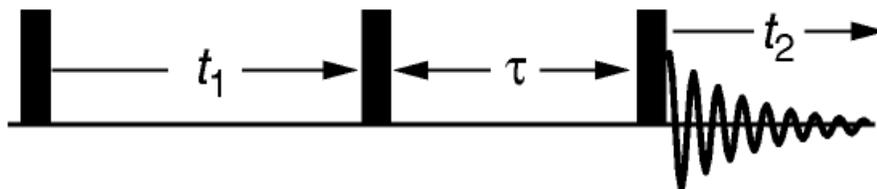


Figura 1.15. Secuencia de pulsos NOESY. Durante t_1 , la magnetización transversa evoluciona de acuerdo con la fase. Esta magnetización transversa es rotada al eje z durante el segundo pulso. Durante el tiempo de mezclado, el cruce de relajación, magnetización en z , es transferida a otros espines. El pulso final rota la magnetización en z , al plano transversa xy , para que la señal pueda ser detectada.

HCCH- TOCSY

(^1H - ^{13}C - ^{13}C - ^1H total correlation spectroscopy)

Este experimento es análogo al espectro en tres dimensiones ^{13}C TOCSY HSQC, que se describió anteriormente, sólo que además transfiere magnetización de ^{13}C a otro ^{13}C . Ello se logra utilizando tres pasos de transferencia de magnetización; primero de ^1H a un enlace de distancia de ^{13}C , por acoplamiento escalar cuyo valor de constante de acoplamiento es $^1J_{\text{CH}} \approx 140\text{Hz}$, después de ^{13}C vecino a ^{13}C vía el acoplamiento escalar donde $^1J_{\text{CC}} \approx 32 - 40\text{Hz}$, y finalmente de ^{13}C nuevamente a ^1H por acoplamiento escalar.

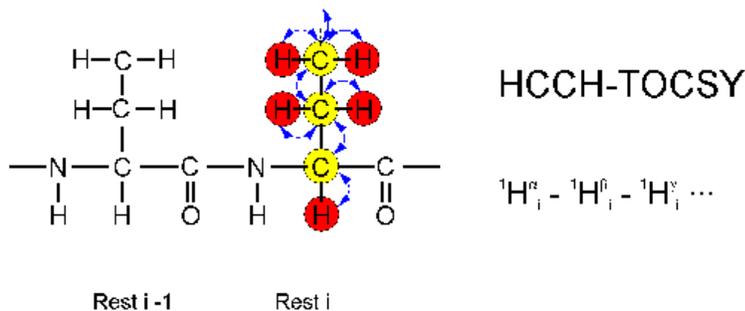


Figura 1.16. Modelo de la transferencia de magnetización en el experimento HCCH TOCSY.

En la Figura 1.17 se muestra la secuencia de pulsos para este experimento. Después del periodo de evolución, t_1 , la magnetización en ^1H es transferida a ^{13}C utilizando una secuencia INEPT (Apéndice A). La magnetización en ^{13}C , que está en antifase, es reenforcada durante los intervalos δ_1 , y esta evoluciona durante el segundo periodo, t_2 , bajo la influencia del desplazamiento químico de ^{13}C . El pulso de 180° anula el efecto del acoplamiento, ^1H - ^{13}C , durante el periodo t_2 y otro pulso de 180° , de baja potencia en la frecuencia de resonancia del carbonilo (^{13}CO), elimina el acoplamiento CO - $\text{C}\alpha$. Al final del periodo de evolución t_2 , un pulso corto, aplicado a lo largo del eje x, desenfoca toda la magnetización en ^{13}C que no esta paralela al campo magnético B_0 . El subsecuente periodo de mezclado isotrópico, transfiere la magnetización remanente de ^{13}C a sus vecinos. Finalmente, una secuencia inversa de pulsos INEPT, envía la magnetización en ^{13}C a los protones, ^1H , que están unidos a dicho núcleo y que son detectados durante t_3 .

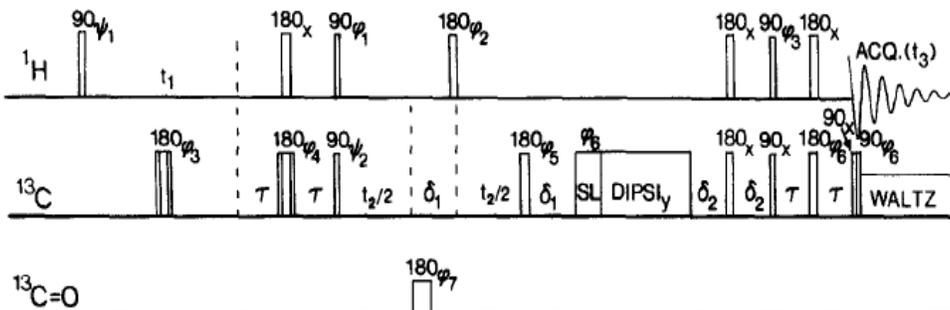


Figura 1.17. Secuencia de pulsos del experimento HCCH TOCSY.

Experimentos de Resonancia Triple

Los experimentos de resonancia triple son utilizados para llevar a cabo la asignación secuencial de proteínas largas; aquellas cuya masa molecular sea mayor de 10kDa, aunque este límite no restringe el uso de estos experimento en péptidos más pequeños. Estos experimentos son llamados de resonancia triple porque se observan tres diferentes núcleos (^1H , ^{13}C , ^{15}N). Como es de suponerse, estos experimentos son hechos en proteínas doblemente enriquecidas (^{13}C , ^{15}N).

La ventaja más importante que presentan los espectros de resonancia triple es su simplicidad. Contrario al traslape que presentan los espectros homonucleares; los espectros de resonancia triple contienen muy pocas señales en cada frecuencia; a menudo sólo una, esta es la razón principal del por qué las proteínas de más de 10kDa pueden ser asignadas con experimentos de resonancia triple.

Sin embargo, las coordenadas de diferentes aminoácidos, claramente separadas en una frecuencia (^{15}N), pueden ser accidentalmente idénticas en las otras (degeneración de señales). En la Figura 1.16 se muestra un ejemplo de señales degeneradas en un espectro HNCA. Así, la adecuada conexión entre aminoácidos es el problema principal en la asignación de señales en espectros de resonancia triple.

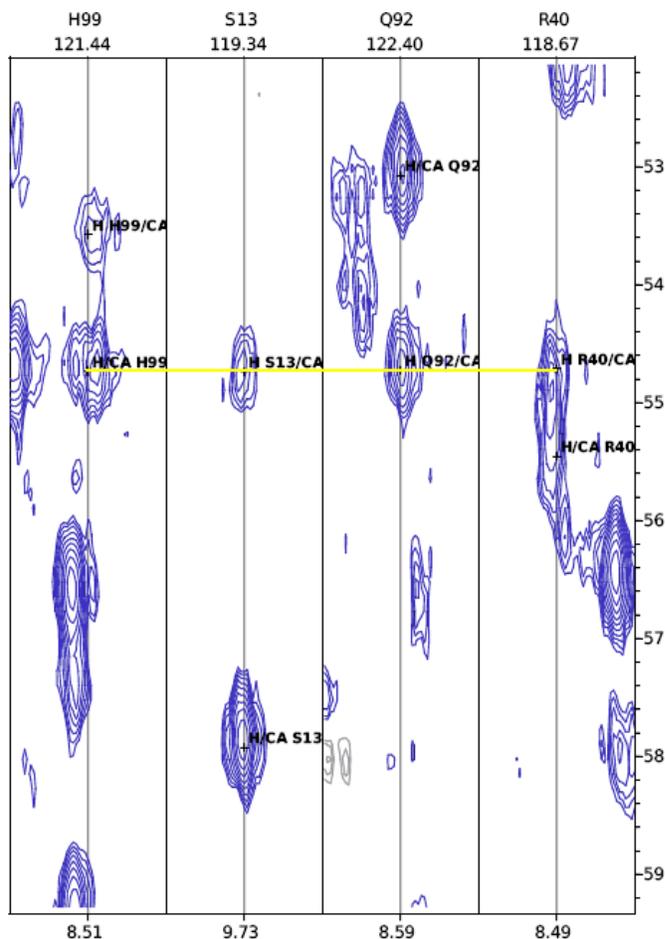


Figura 1.16. Franjas del espectro HNCA donde se observa degeneración de señales, lo que significa que éstas son independientes entre sí, pero que presentan el mismo desplazamiento químico en ^{13}C .

Otra ventaja de los espectros de resonancia triple es su alta sensibilidad, la cual es causada por una eficiente transferencia de coherencia. Ésta es transferida vía un acoplamiento o dos como se muestra en la Figura 1.17:

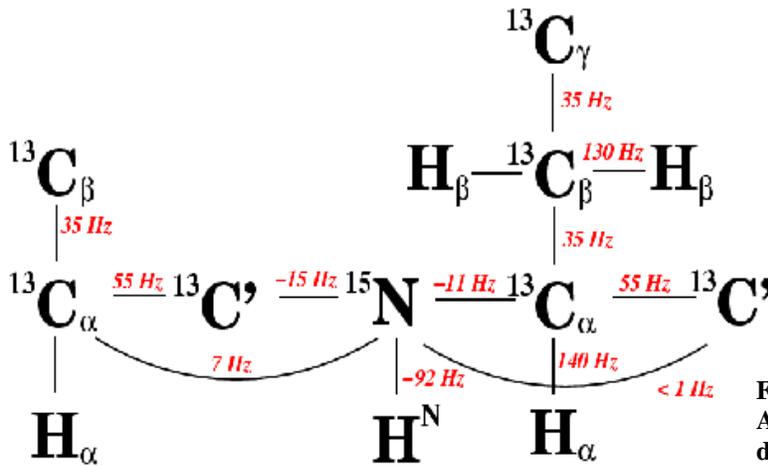


Figura 1.17. Valores de las Constantes de Acoplamiento a uno y dos enlaces de distancia, 1J y 2J .

Por lo tanto, los tiempos de transferencia y los periodos de relajación son más cortos que en los experimentos homonucleares.

Nomenclatura de los Experimentos de Resonancia Triple

Los nombres de los experimentos de resonancia triple son muy descriptivos, estos se asignan con el siguiente parámetro: los nombres de todos los núcleos que están siendo usados para transferir magnetización durante el experimento están listados en el orden de uso, poniendo entre paréntesis los nombres de los núcleos que son usados sólo para transferir coherencia y sus frecuencias no son detectadas. A continuación se describen los espectros utilizados.

HNCA y HN(CO)CA

Los experimentos HNCA y HN(CO)CA correlacionan los espines de los átomos de $^1H^N$, ^{15}N y $C\alpha$ que se encuentran en el esqueleto de la proteína. El HNCA correlaciona el $^1H^N$ y ^{15}N de cada amida con el carbono alfa del intra residuo, $C\alpha$, y el carbono alfa del residuo anterior, $C\alpha-1$, como se muestra en la Figura 1.18:

HNCA

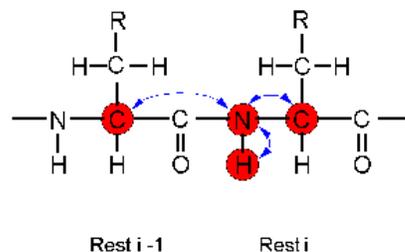
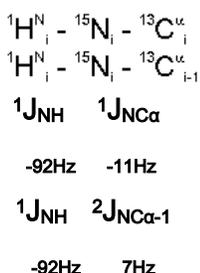


Figura 1.18. Modelo de la transferencia de coherencia en el experimento HNCA. El $^1H^N$ es excitado y transfiere la coherencia, vía acoplamiento escalar a un enlace de distancia 1J , al ^{15}N . Posteriormente, éste transfiere la coherencia al $C\alpha$ mediante 1J y a $C\alpha-1$ por medio de acoplamiento escalar a dos enlaces de distancia 2J .

Mientras que el HN(CO)CA correlaciona el $^1\text{H}^{\text{N}}$ y ^{15}N de cada amida sólo con el carbono alfa del residuo anterior, $\text{C}\alpha_{-1}$. En este último, la coherencia es transferida de ^{15}N a ^{13}CO y de este al $\text{C}\alpha_{-1}$ (Figura 1.19). Entonces, con el experimento HN(CO)CA se asigna la señal debida al $\text{C}\alpha_{-1}$ en el espectro HNCA (Figura 1.20).

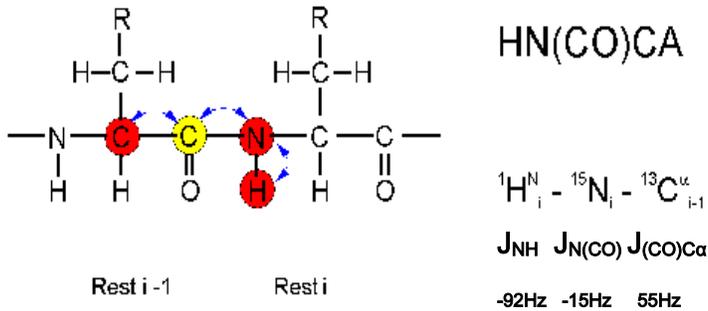


Figura 1.19. Modelo de transferencia de coherencia del experimento HN(CO)CA. En éste se transfiere coherencia vía acoplamientos escalares a un enlace de distancia, 1J , entre el ^{15}N y el ^{13}CO , luego entre el ^{13}CO y el $\text{C}\alpha_{-1}$.

En la Figura 1.20 se muestra una franja del experimento HNCA y HNCOCA donde se observa cómo se lleva a cabo la secuenciación. Este punto se ampliará en el Desarrollo Experimental.

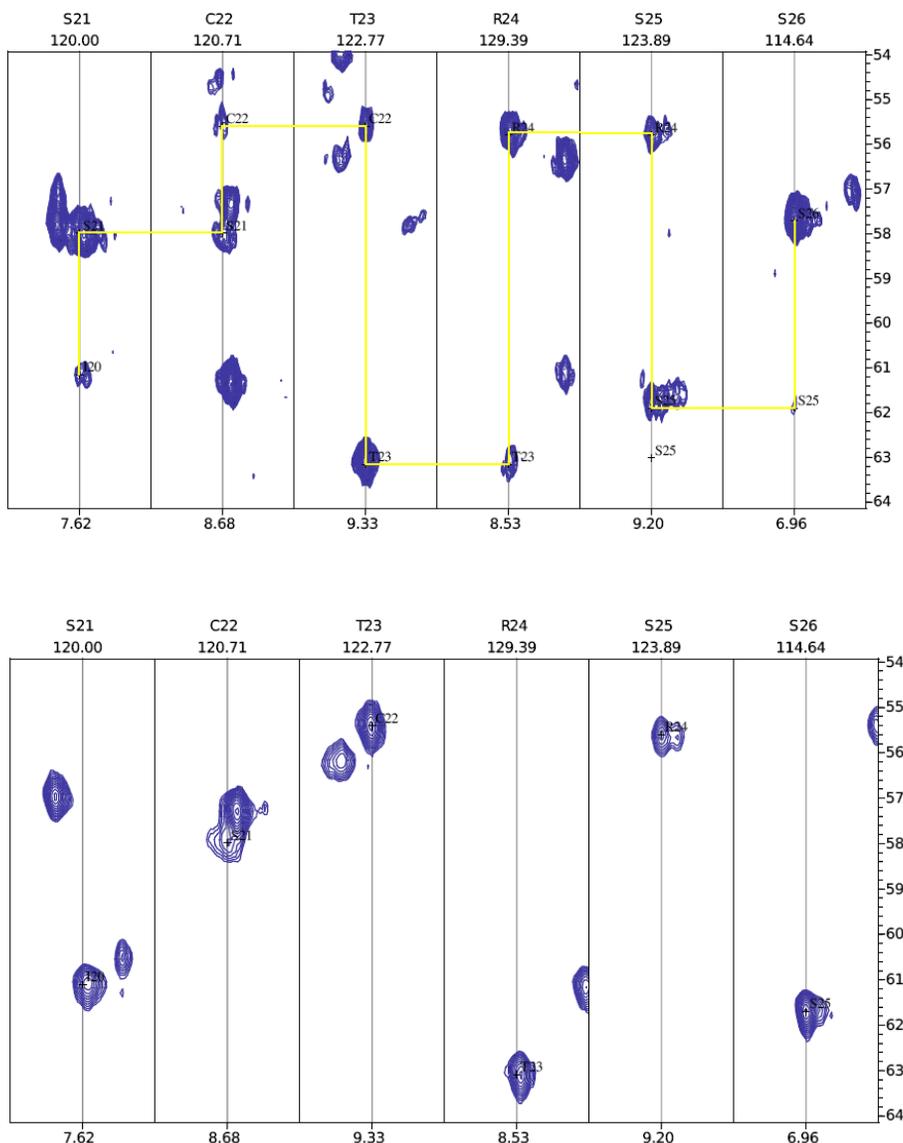


Figura 1.20. Franjas del espectro HNCA y HNCOCA de S21-S26. En HNCA (arriba) se señala la secuenciación con una línea amarilla y en HNCOCA se muestran los espines $\text{C}\alpha_{-1}$.

Para los experimentos de Triple Resonancia sólo describiremos la secuencia de pulsos del HNCA, ya que resulta ilustrativa para entender, de manera general, cómo se adquieren e interpretan este tipo de experimentos (Figura 1.21).

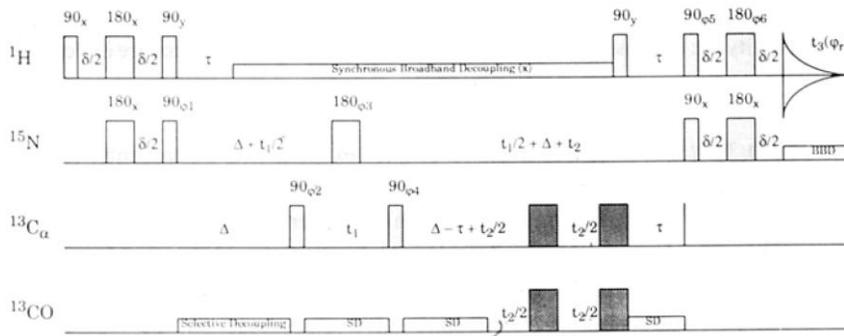


Figura 1.21. Secuencia de Pulsos del experimento HNCA

En ésta, primero se transfiere magnetización del $^1\text{H}^{\text{N}}$, al ^{15}N vía una secuencia INEPT. De esto resulta una magnetización de ^{15}N que está en antifase. Durante t_1 , el desplazamiento químico de ^{15}N evoluciona, los acoplamientos escalares entre el ^{15}N y el $^1\text{H}^{\text{N}}$, $^{13}\text{C}\alpha$ y ^{13}CO son eliminados mediante el pulso de 180° a la mitad de t_1 que permite reenfocar el acoplamiento. Durante el periodo de evolución t_2 , la magnetización en ^{15}N está en antifase con respecto a los $^{13}\text{C}\alpha$ con los que está acoplado. En este punto sólo evoluciona el acoplamiento $^1\text{H}-^{15}\text{N}$, la duración de t_2 depende del tiempo necesario para que al finalizar ^{15}N esté en antifase ahora con $^1\text{H}^{\text{N}}$. La evolución del acoplamiento escalar con ^{13}CO es reenfocado con el pulso de 180° a la mitad del periodo de evolución t_2 . Así, los componentes relevantes en este tiempo es la transferencia de coherencia del intra e interresiduo por acoplamiento escalar $^{15}\text{N} - ^{13}\text{C}\alpha$ y $^{15}\text{N} - ^{13}\text{C}\alpha-1$. El pulso de 90° aplicado posteriormente a $^1\text{H}^{\text{N}}$ y $^{13}\text{C}\alpha$ provoca que exista coherencia múltiple en los tres espines; $^1\text{H}^{\text{N}} - ^{15}\text{N} - ^{13}\text{C}\alpha$. Durante el siguiente periodo de evolución t_2 , los desplazamientos químicos de $^1\text{H}^{\text{N}}$ y ^{15}N son reenfocados con un pulso de 180° aplicado a ambos núcleos. Entonces, la evolución de la coherencia en los tres espines no evoluciona bajo la influencia de los acoplamientos escalares.

HNCO y HN(CA)CO

El experimento HNCO correlaciona el desplazamiento químico de ^1H y el ^{15}N de la amida (HN) de un aminoácido, con el desplazamiento químico de ^{13}CO del residuo anterior, vía el acoplamiento escalar del enlace $^{15}\text{N}-^{13}\text{CO}$ donde $^1J_{\text{NCO}} \approx 15\text{Hz}$, para establecer la correlación secuencial (Figura 1.22).

HNCO

$^1\text{H}_i^{\text{N}} - ^{15}\text{N}_i - ^{13}\text{CO}_{i-1}$

$J_{\text{NH}} \quad J_{\text{N}(\text{CO}-1)}$

-92Hz -15Hz

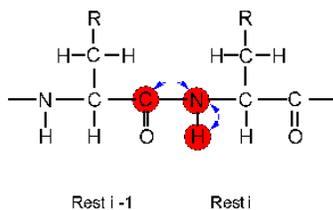


Figura 1.22. Modelo de transferencia de magnetización en un experimento HNCO. En este se transfiere magnetización del $^1\text{H}^{\text{N}}$ al ^{15}N y de éste al ^{13}CO del residuo anterior, CO-1, vía acoplamientos a un enlace de distancia 1J .

Las conectividades secuenciales que se observan en este experimento son particularmente útiles en conjunto con las conectividades interresiduo observadas en el experimento HNCACO.

En el experimento HNCACO se observan correlaciones entre el desplazamiento químico del ^1H , el ^{15}N y el ^{13}CO de la amida vía los acoplamientos escalares a un enlace de distancia de $^{15}\text{N}-^{13}\text{C}\alpha$ y $^{13}\text{C}\alpha-^{13}\text{CO}$ y también se observa la conectividad secuencial del espín ^{15}N con el ^{13}CO del residuo anterior vía los acoplamientos $^{15}\text{N}-^{13}\text{C}\alpha-1$ y $^{13}\text{C}\alpha-1-^{13}\text{CO}-1$.

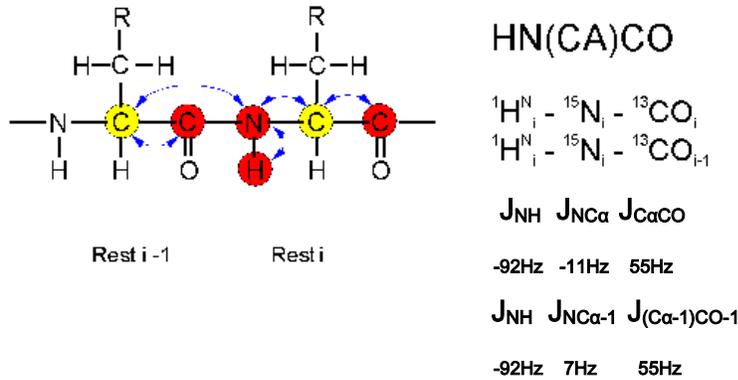


Figura 1.23. Modelo de la transferencia de magnetización en el experimento HN(CA)CO.

HNCACB y CBCACONH

Estos experimentos correlacionan el desplazamiento químico del $^{13}\text{C}\alpha$ y $^{13}\text{C}\beta$ con el ^1H y el ^{15}N de la amida que conforman el aminoácido. Estas correlaciones son de gran utilidad cuando existen degeneraciones de desplazamientos químicos de $^{13}\text{C}\alpha$ y $^1\text{H}\alpha$. Además, los desplazamientos químicos del $^{13}\text{C}\alpha$ y $^{13}\text{C}\beta$ ofrecen información del tipo de sistema de espín que presenta cada aminoácido.

En las Figuras 1.24 y 1.25 se muestra de manera gráfica, la transferencia de magnetización que ocurre en estos experimentos.

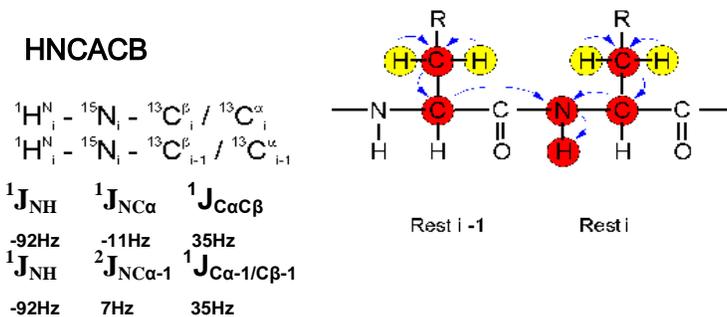


Figura 1.24. Modelo de la transferencia de magnetización del experimento CBCANH

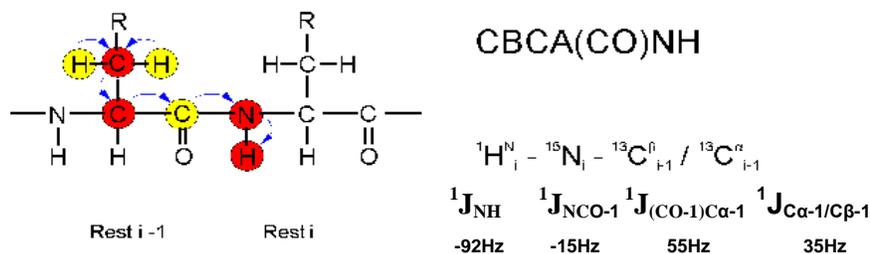


Figura 1.25. Modelo de transferencia de magnetización del experimento CBCA(CO)NH

Para finalizar nuestra revisión general de los experimentos de resonancia triple; en la Figura 1.26 se muestra la relación señal/ruido para cada uno. Este es uno de los parámetros para determinar la sensibilidad en los experimentos.

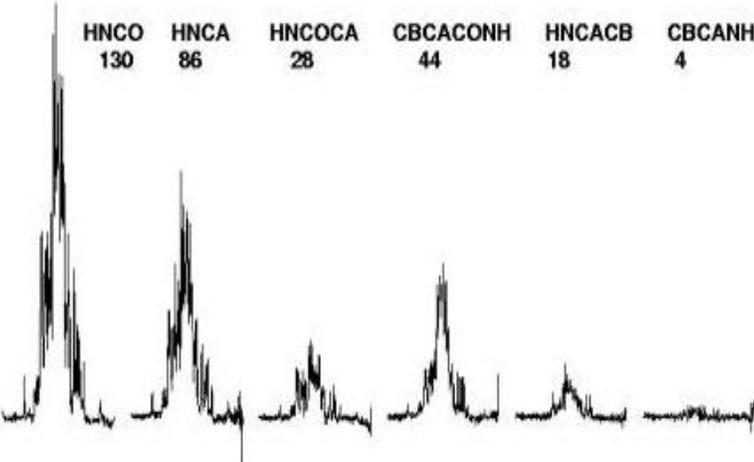


Figura 1.26. Se muestra el primer incremento de algunos espectros de Resonancia Triple de la misma muestra. El número indica la relación señal/ruido.

Desarrollo Experimental

En la Figura 2.1 se esquematiza el procedimiento general para la realización de este trabajo:

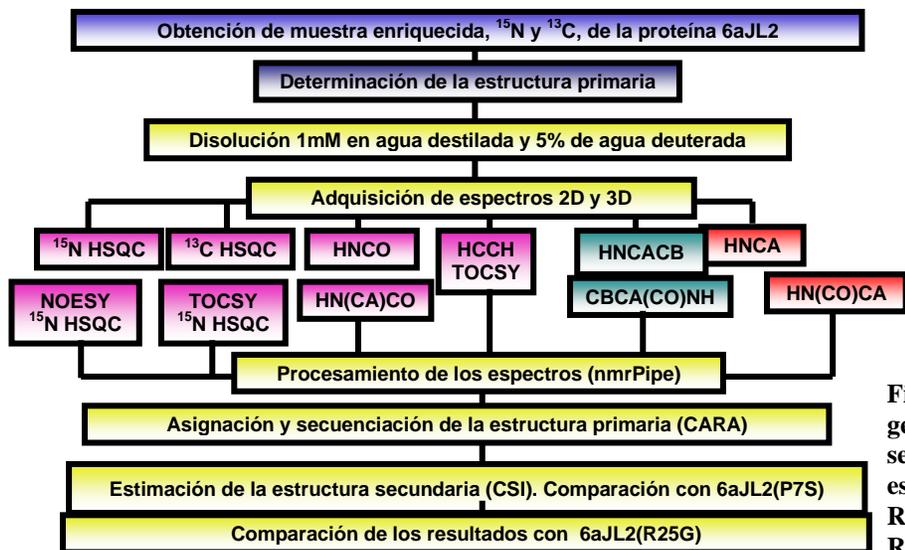
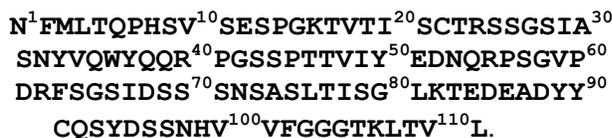


Figura 2.1. Diagrama del procedimiento general. La estimación de la estructura secundaria se comparó con la estructura obtenida por difracción de Rayos X de 6aJL2(P7S) (Dra. Rodríguez. Comunicación Directa)

Se obtuvo una muestra enriquecida con ^{15}N y una doblemente enriquecida, ^{13}C y ^{15}N , de 6aJL2 en el grupo de investigación del Dr. Becerril. Se purificó y se determinó la estructura primaria:



Posteriormente, cada muestra se llevó a una concentración de 12mg/mL (1mM) con 5% de agua deuterada y se obtuvieron los experimentos ^{15}N -HSQC y ^{13}C -HSQC en un equipo Varian Inova de 500MHz en el Instituto de Química:

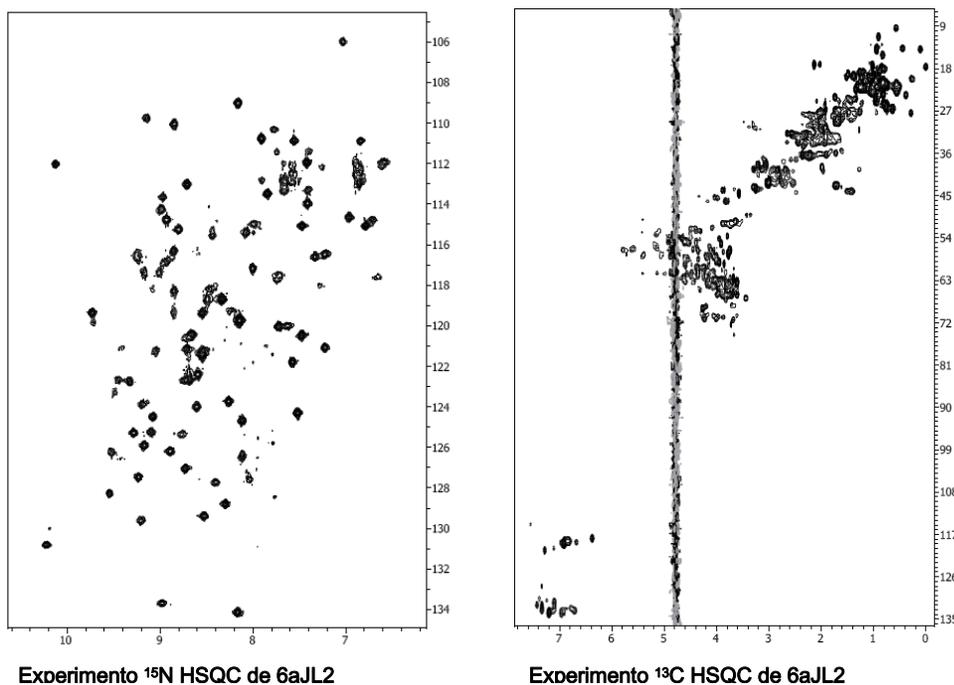


Figura 2.2. Espectro ^{15}N HSQC y ^{13}C HSQC obtenidos luego del procesamiento de los FIDs de cada uno.

También se obtuvieron los experimentos en tres dimensiones ^{15}N NOESY HSQC, ^{15}N TOCSY HSQC, HCCH TOCSY, HNCOC y HNCACO. Los experimentos HNCA y HNCOCA, en un equipo Bruker de 500MHz en el Laboratorio Central de la UAM, Iztapalapa. Cabe mencionar que es la primera vez que se montan las secuencias de pulsos para estos experimentos en México. Los experimentos HNCACB y CBCACONH, en un equipo Varian Inova de 600MHz en el Medical Center de la Universidad de Texas.

Una vez que se adquirieron los FID's de cada experimento; se manipularon mediante textos de procesamiento en el programa nmrPipe (Delaglio,1995), como se describe en el Apéndice B. Dicha manipulación se llevó a cabo en el procesador SACBE (PC dual con dos procesadores Pentium III a 1GHz, 1024Mb de memoria RAM y sistema operativo LINUX), con el editor de textos *vi*. Todos los textos de procesamiento se optimizaron para ser utilizados durante el desarrollo de los proyectos del Laboratorio de Bioquímica I. A continuación se muestra un texto de procesamiento de uno de los experimentos 2D:

```
#!/bin/csh

#
# Basic 2D Phase-Sensitive Processing:
# Cosine-Bells are used in both dimensions.
# Use of "ZF -auto" doubles size, then rounds to power of 2.
# Use of "FT -auto" chooses correct Transform mode.
# Imaginaries are deleted with "-di" in each dimension.
# Phase corrections should be inserted by hand.

nmrPipe -in /test.fid \
| nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 1.00 -pow 1 -c 1.0 \
| nmrPipe -fn ZF -auto \
| nmrPipe -fn FT -auto \
| nmrPipe -fn PS -p0 174.6 -p1 -50.0 -di -verb \
| nmrPipe -fn EXT -left -sw \
| nmrPipe -fn TP \
| nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 1.00 -pow 1 -c 1.0 \
| nmrPipe -fn ZF -auto \
| nmrPipe -fn FT -auto \
| nmrPipe -fn PS -p0 0.0 -p1 0.0 -di -verb \
  -ov -out /test.ft2
```

Como se describe en el Apéndice B, el FID es tratado por componentes vectoriales, donde la primera dimensión se multiplica por la función seno (SP), se asigna el valor de cero a todos los puntos no definidos (ZF), se aplica transformada de Fourier en todo el dominio D_1 , reales e imaginarios (TF), se corrige la línea base (PS) y se extrae la sección de la ventana espectral que interesa (EXT).

Con el comando TP, se traspone la matriz a la segunda dimensión y se le aplican las funciones que le siguen. Ahora la segunda dimensión se multiplica por la función seno (SP); se asigna el valor de cero a los puntos no definidos, se aplica una segunda transformada de Fourier en todo el dominio D_2 , reales e imaginarios (TF), se corrige la línea base (PS) y se escribe el archivo de salida (-out).

Una vez que se procesó cada experimento, los espectros obtenidos se convierten a formato .3D.16 y .3D.param, mediante la función *pipe2xeasy*. Ésta, es una función que ofrece nmrPipe para que los espectros puedan ser leídos con el programa CARGA 1.8.

La asignación de las señales de ^1H , ^{13}C y ^{15}N de cada sistema de espín, se realizaron en el programa CARGA y Xeasy. A continuación se describe el procedimiento que se llevó a cabo.

Procedimiento de Asignación

Se asignó un número arbitrario a cada pico de intersección ($^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N) sobre el experimento ^{15}N -HSQC (Figura 2.3). Posteriormente se llevó a cabo la calibración del espectro utilizando el pico 150. Se eligió ésta señal porque es la más desplazada a menores ppm sobre ^{15}N , ello permitirá que sea fácilmente identificable en los espectro 3D (Figura 2.3).

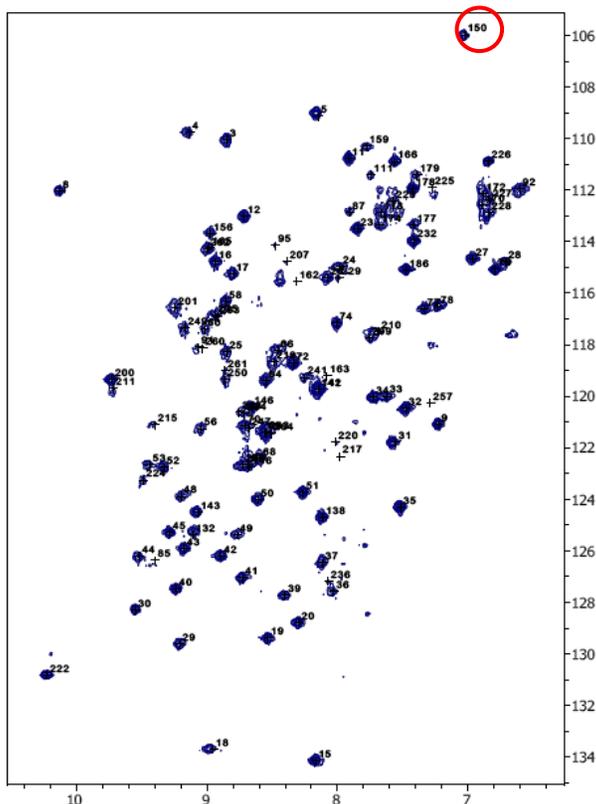


Figura 2.3. Espectro ^{15}N HSQC que muestra la asignación de picos que se realizó arbitrariamente. Señala con un círculo rojo el pico que se utilizó para llevar a cabo la calibración.

Una vez que se calibró el espectro ^{15}N HSQC, también se calibraron las dos dimensiones, ^1H y ^{15}N , del HNCA y HNCOCA, usando como referencia el pico 150 (Figura 2.4). Entonces, fue posible asignar los átomos $\text{C}\alpha$ y $\text{C}\alpha-1$ sobre el HNCA, ya que correlacionan con cada pico de intersección ($^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N) observado en el espectro ^{15}N HSQC. (Figura 2.4):

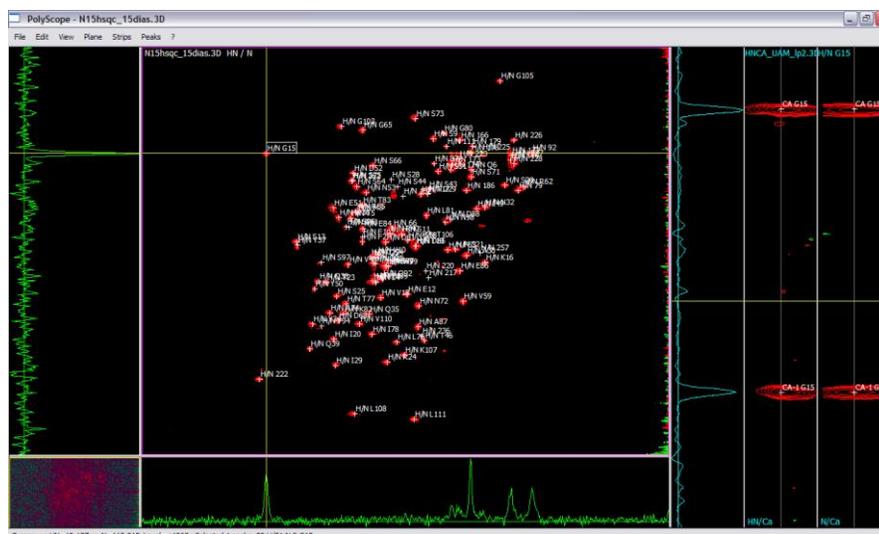


Figura 2.4. Ventana *POLYSCOPE* del programa *CARA 1.8*, que muestra, en la ventana menor, la franja del plano (^1H , ^{13}C) del espectro HNCA, que correlaciona con el pico $^1\text{H}^n$, ^{15}N que se señala sobre ^{15}N HSQC (ventana mayor).

Para esquematizar mejor lo que se observa en la ventana *PolyScope*, imaginemos que un espectro HNCOCA es el siguiente cubo:

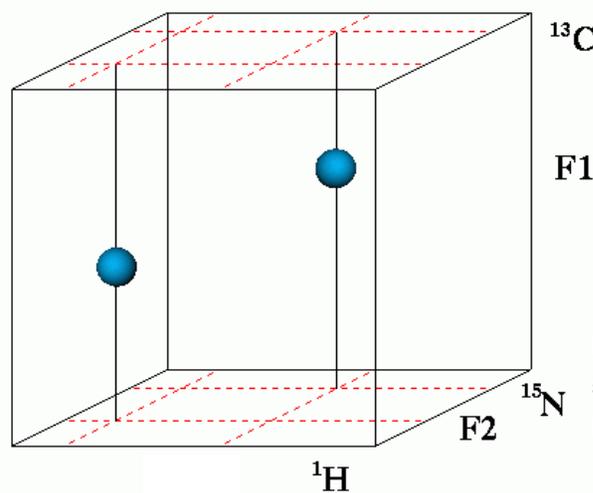


Figura 2.5. Esquema 3D de dos señales debidas a un espectro HNCOCA.

El plano compuesto por (^1H , ^{15}N), es el plano que se observa en la ventana mayor de *Poly Scope*, que también es el espectro ^{15}N HSQC. Si seleccionamos una de las coordenadas (^1H , ^{15}N) sobre dicho plano; en la ventana menor aparece la franja del plano (^1H , ^{13}C) que correlaciona con esta señal. Es decir, se observan las curvas de nivel debidas a las componentes de la esfera (que es la señal 3D) en cada plano. El espectro ^{15}N HSQC no es exactamente igual que el plano ^1H , ^{15}N del experimento HNCA, ya que en el primero también están las señales debidas a correlaciones ^1H - ^{15}N de las cadenas laterales de algunos aminoácidos. Esto resulta ventajoso para la asignación, ya que las señales sobre ^{15}N HSQC que no presenten correlaciones con $^{13}\text{C}\alpha$; es decir, que al ser seleccionadas no refieran a algún plano ^1H , ^{13}C de

HNCA, no son señales de amida de la cadena principal, sino correlaciones ^{15}N - ^1H presentes en las cadenas laterales.

Posteriormente, mediante la opción *Strip Scope* del programa CARRA 1.8, se desplegaron las diferentes franjas de los espectros HNCA y HNCOCA sobre el plano de ^{15}N , de tal manera que fueran visibles franjas de los planos ^1H , $^{13}\text{C}\alpha$. Entonces se secuenciaron aquellos átomos, $\text{C}\alpha$ y $\text{C}\alpha-1$, que presentaban el mismo desplazamiento químico (Figura 2.6).

Sin embargo existen gran cantidad de casos en los que más de dos átomos de $\text{C}\alpha$ y $\text{C}\alpha-1$ presentan el mismo desplazamiento químico, ello debido a que se presenta degeneración de señales. Así que fue necesario utilizar el espectro ^{15}N NOESY HSQC para verificar que existieran correlaciones NOE entre, por lo menos, los dos protones de amidas consecutivas (Figura 2.7). Por supuesto, éste y todos los experimentos siguientes fueron calibrados usando como referencia el pico 150.

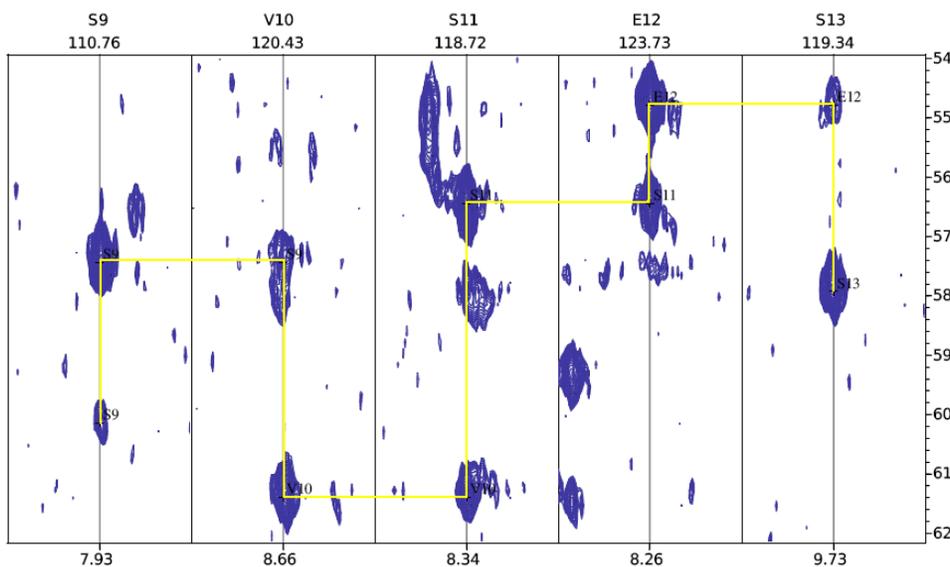


Figura 2.6. Franjas del espectro HNCA que muestran la correlación interresiduo del S9-S13. En este caso se señala el desplazamiento químico de ^{15}N en la parte superior del espectro mientras que en la parte inferior se muestra el desplazamiento químico de ^1H y de lado izquierdo la ventana espectral de la franja de ^{13}C .

Para utilizar el espectro ^{15}N NOESY HSQC, fue necesario asignar el sistema de espín para cada aminoácido. Ello se realizó sobre el espectro ^{15}N TOCSY HSQC, y así fue posible diferenciar las señales propias de cada sistema de espín, de las demás señales NOE (Figura 2.8).

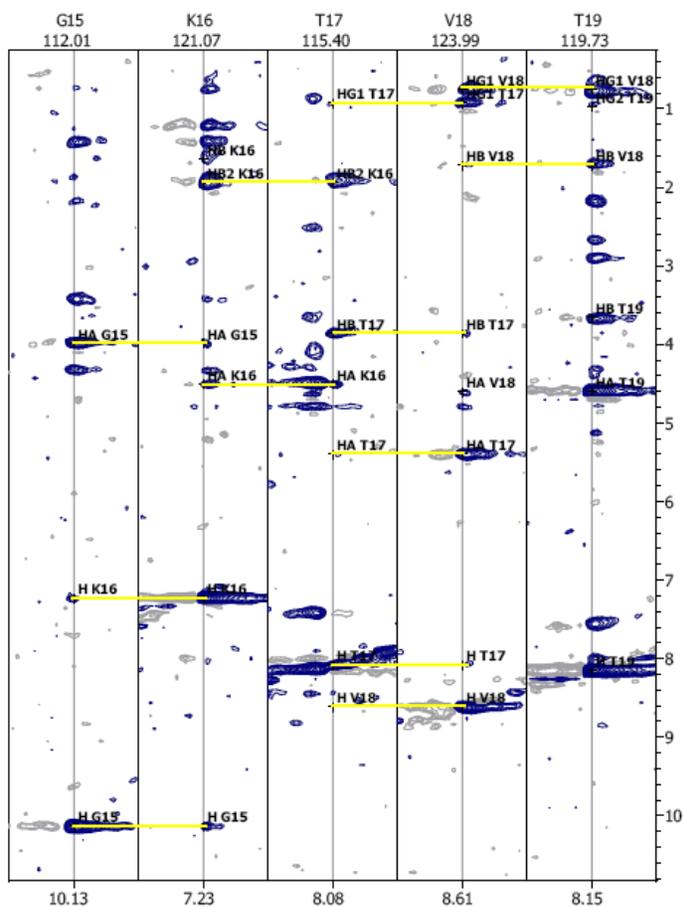


Figura 2.7. Franjas del espectro ^{15}N NOESY HSQC, que pertenecen al residuo G15-T19. Se señalan con una línea amarilla las señales NOE que correlacionan con el átomo del aminoácido siguiente.

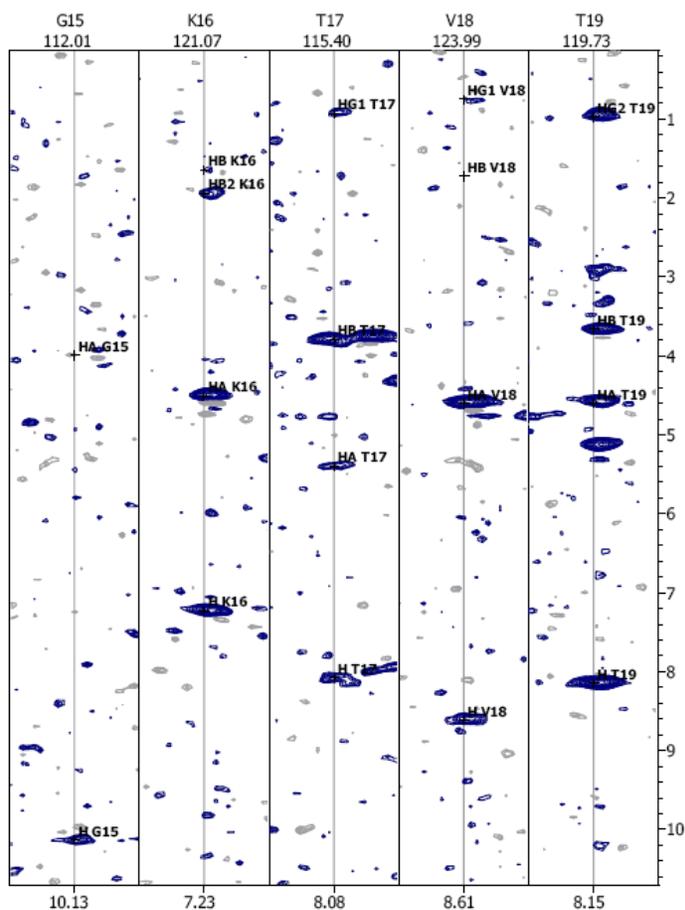


Figura 2.8. Franjas del espectro ^{15}N TOCSY HSQC que pertenecen al residuo G15-T19. Sólo se observan las señales de cada sistema de espín.

En la Figura 2.9 se muestra un patrón de señales TOCSY para tres sistemas de espín. En el Anexo I se indica para todos.

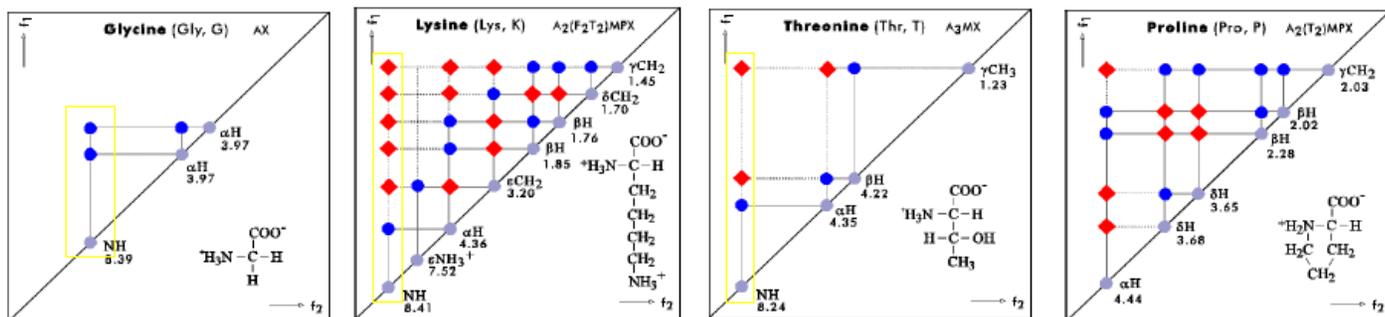


Figura 2.9. Patrón de señales TOCSY para cuatro sistemas de espín. Con el recuadro amarillo se indica la columna sobre el $^1\text{H}^{\text{N}}$ (NH); ésta es la única que se observa en un experimento 3D, ^{15}N TOCSY HSQC. El sistema de espín de Prolina no presenta señales en este tipo de espectros, ya que se trata de una amida N,N disustituida donde el ^{15}N no tiene correlación con ^1H y por lo tanto, no tiene componentes sobre el plano ^1H , ^{15}N .

En este punto, es posible llevar a cabo la asignación de la secuencia, ya que conocemos el patrón de señales para cada sistema de espín. Sin embargo, existen varios aminoácidos que presentan el mismo patrón, y ya que sólo observamos las correlaciones que están en la columna de $^1\text{H}^{\text{N}}$; es arriesgado elegir a qué aminoácido corresponde cada uno sin considerar otro parámetro. Por tanto, se asignó el desplazamiento químico del $\text{C}\beta$ en el espectro CBCACONH y HNCACB (Figura 2.10). Así, es posible no sólo secuenciar el $\text{C}\beta$ y $\text{C}\beta-1$; también podemos comparar los desplazamientos químicos que presentan, con los reportados en tablas estadísticas (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Intervalo y promedio de Desplazamientos Químicos (ppm) más comunes donde aparece el $^{13}\text{C}_{\alpha,\beta}$ de cada AA.

Aminoácido		$\text{C}\alpha$			$\text{C}\beta$			$\text{C}\gamma$		
		Mínimo	Máximo	Promedio	Mínimo	Máximo	Promedio	Mínimo	Máximo	Promedio
Alanina	ALA	17.29	99.00	53.16	-40.99	99.00	19.01	49.30	185.42	177.70
Arginina	ARG	8.37	70.69	56.79	20.95	82.18	30.68	2.20	184.51	176.39
Aspartato	ASP	39.80	68.47	54.65	25.70	138.16	40.88	130.92	219.00	176.42
Asparagina	ASN	2.20	99.00	53.50	1.96	99.00	38.72	2.20	181.99	175.26
Cisterna	CYS	41.91	68.54	57.88	19.78	73.92	33.50	2.20	182.73	174.67
Glutamato	GLU	28.80	82.05	57.36	9.08	114.27	30.03	8.22	190.58	176.90
Glutamina	GLN	4.10	69.63	56.54	20.27	79.68	29.17	7.24	184.44	176.31
Glicina	GLY	2.20	95.10	45.36	-	-	-	2.20	183.16	173.89
Histidina	HIS	23.91	118.60	56.51	17.80	80.78	30.26	2.20	182.80	175.16
Isoleucina	ILE	39.67	77.93	61.53	20.94	87.68	38.64	130.51	183.10	175.82
Leucina	LEU	44.60	85.60	55.62	16.38	93.18	42.28	22.96	228.49	176.96
Lisina	LYS	43.10	82.05	56.91	-26.69	82.98	32.78	32.87	996.25	176.70
Metionina	MET	45.50	72.49	56.15	0.20	83.38	33.04	2.20	183.16	176.15
Fenilalanina	PHE	22.72	73.43	58.10	21.40	88.78	39.96	124.30	187.61	175.49
Prolina	PRO	26.45	73.44	63.29	25.44	81.08	31.89	117.05	182.30	176.66
Serina	SER	24.40	76.07	58.67	0.00	171.73	63.77	128.34	197.10	174.63
Treonina	THR	50.94	82.16	62.17	7.00	77.71	69.59	61.78	184.43	174.52
Triptofano	TRP	44.69	69.76	57.62	14.53	82.08	30.15	168.17	181.89	176.08
Tirosina	TYR	2.20	65.80	58.09	28.82	89.58	39.32	2.20	182.92	175.40
Valina	VAL	50.13	78.44	62.43	20.24	83.58	32.72	130.51	183.21	175.63

Con ello se cuenta con los elementos suficientes para hacer una hipótesis de asignación y proponer qué sistema de espín corresponde a qué aminoácido.

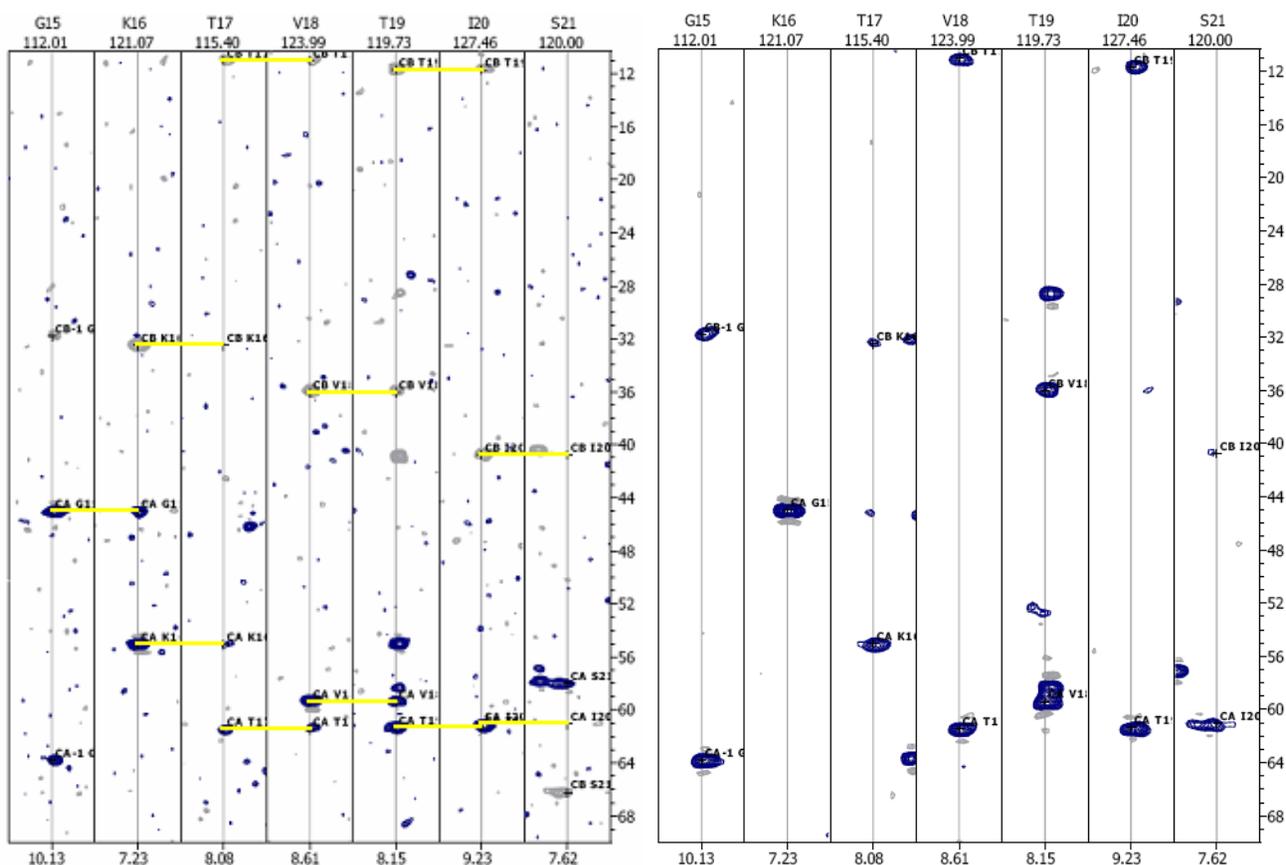


Figura 2.10. En el primer recuadro se muestran las franjas del espectro HNCACB del residuo G15-S21, las correlaciones de núcleos subsiguientes se señalan con una línea amarilla. En el segundo recuadro, las franjas del espectro CBCACONH del residuo G15-S21, donde se muestran las señales de C α v C β del sistema de espín anterior.

Finalmente, se asignaron los desplazamientos químicos correspondientes a los grupos CO (Figura 2.11). Luego se corroboró que los desplazamiento químico de estos núcleos, CO y CO-1, coincidieran respectivamente. De no ser así, fue necesario proponer otra secuenciación hasta que todos los parámetros fueran congruentes. Entonces, fue posible asignar casi la totalidad de la secuencia.

Los datos de desplazamiento químico para todos los átomos, se enlistan en el Anexo II.

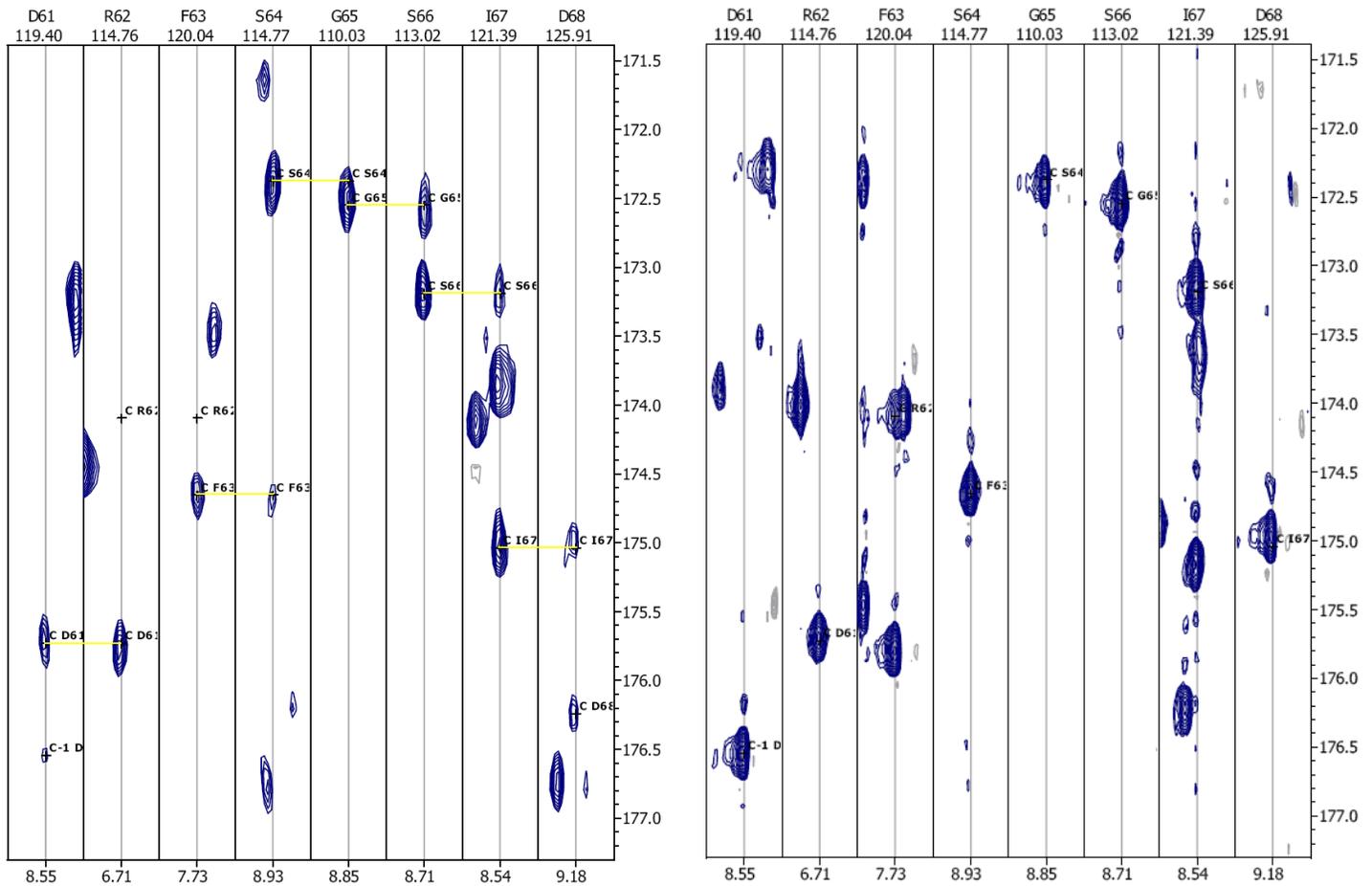


Figura 2.11. En el primer recuadro se muestran franjas del espectro HNCACO, D61-D68, con una línea amarilla se señala la correlación de CO y CO_{i-1}. En el segundo recuadro se muestra la asignación de CO_{i-1} en franjas del espectro HNCO. Cabe destacar que la señal de R62 no se observa en el HNCACO, tanto en CO como en CO_{i-1}, sin embargo CO_{i-1} se observa en HNCO, y ya que no existe alguna otra señal sobre HNCACO que sugiera otro desplazamiento químico, se lleva a cabo la asignación y secuenciación.

Luego se estimó la estructura secundaria con el programa estadístico CSI (University of Alberta) y, ya que se cuenta con la estructura obtenida por Difracción de Rayos X de 6aJL2(P7S) (Figura 2.12), que es un dominio variable recombinante del conjunto de genes 6a y JL2 con una mutación Pro7Ser, se comparó la estructura secundaria de 6aJL2 y 6aJL2(P7S). Dichas estructuras resultaron similares en un 90%.

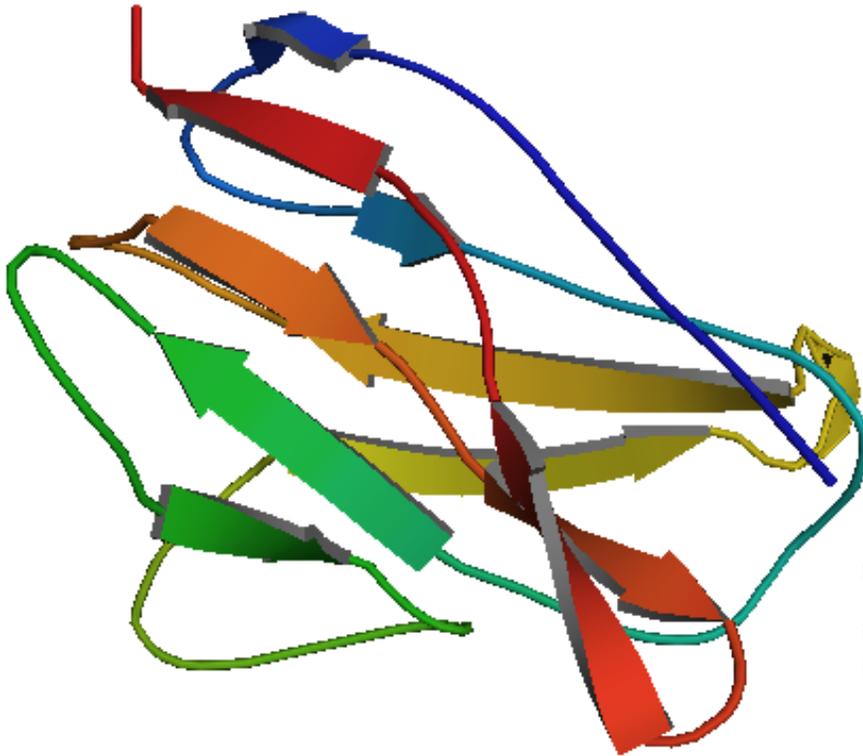


Figura 2.12. Estructura tridimensional de la proteína 6aJL2(P7S). Se obtuvo por Difracción de Rayos X en el grupo de investigación de la Dra. Rodríguez (en proceso de publicación).

Se ha reportado la tabla de desplazamientos químicos de 6aJL2(R25G) (Gutiérrez-González, 2007). Éste es un dominio variable susceptible a fibrilarse (fibrillogénico).

Entonces se comparó el desplazamiento químico de los núcleos de 6aJL2 y 6aJL2(R25G). En la Tabla 2.13 se muestra un conjunto de gráficas que indican la comparación del desplazamiento químico que presentan los núcleos de $^{15}\text{N}^{\text{H}}$, $\text{C}\alpha$, $^1\text{H}^{\text{N}}$, $^1\text{H}\alpha$ de 6aJL2 y 6aJL2(R25G). Las diferencias en el desplazamiento se deben a que la mutación Arg 24 Gly modifica la estructura 3D de 6aJL2, provocando que 6aJL2(R25G) sea un dominio variable altamente fibrillogénico.

Comparación del desplazamiento químico de 6aJL2 (●) vs 6aJL2R25G (●)

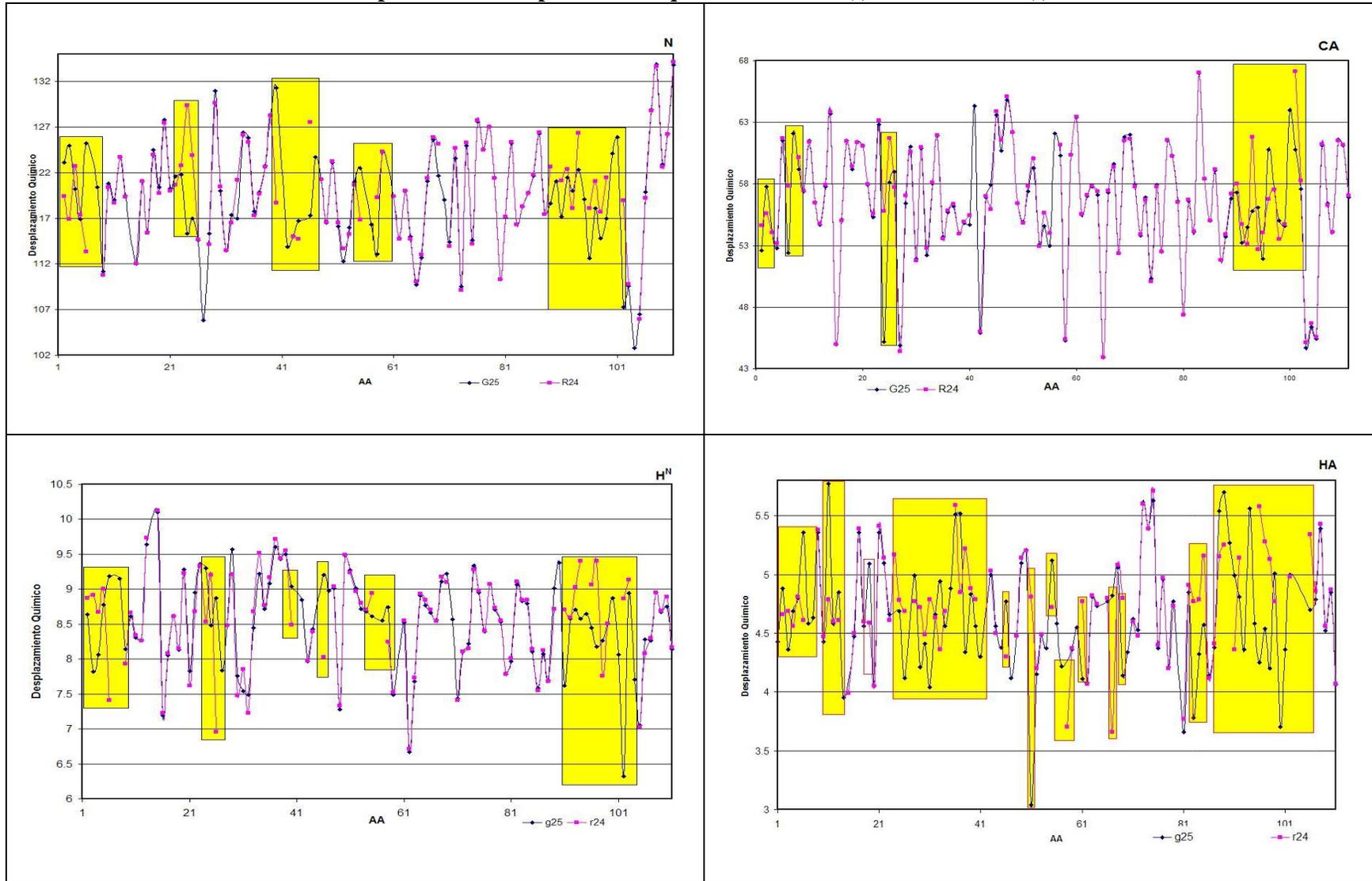


Figura 2.13. Gráficas comparativas del desplazamiento químico de ^{15}N , $^{13}\text{C}\alpha$, $^1\text{H}^{\text{N}}$ y $^1\text{H}\alpha$, que presenta 6aJL2 y 6aJL2R25G. Con un recuadro amarillo se señalan las zonas que presentan variaciones considerables en el desplazamiento químico.

De las 119 señales $^1\text{H}^{\text{N}}, ^{15}\text{N}$ observadas en ^{15}N HSQC, 93 fueron asignadas a un sistema de espín de los 111 que componen a la proteína. Mientras que 22 señales $^1\text{H}^{\text{N}}, ^{15}\text{N}$, corresponden a correlaciones en las cadenas laterales, ya que no presentan acoplamiento con $^{13}\text{C}\alpha$.

Considerando el número de aminoácidos que presentan enlaces N-H en cadena lateral; habría 25 señales ($^1\text{H}^{\text{N}}, ^{15}\text{N}$) sin correlación con $^{13}\text{C}\alpha$. En la Tabla 3.1 se muestran los AA involucrados:

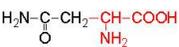
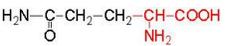
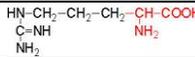
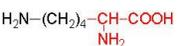
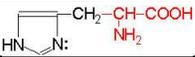
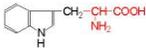
Aminoácidos* (AA)	En la secuencia de 6aJL2	Enlaces N-H (R)
Asparagina, Asn, N 	N1, N32, N53, N72, N98	5
Glutamina, Gln, Q 	Q6, Q35, Q38, Q39, Q54, Q92	6
Arginina, Arg, A 	R24, R40, R55, R62	8
Lisina, Lys, K 	K16, K82, K107	3
Histidina, His, H 	H8, H99	2
Triptófano, Trp, W 	W36	1
Total aproximado de señales N-H sin correlación con Cα que se observarían en ^{15}N HSQC		25

Tabla 3.1. En la primera columna se muestra el nombre del aminoácido, la abreviatura con una y tres letras y la estructura de cada uno; con rojo los átomos de la cadena principal y con negro las cadenas laterales. En la segunda columna se enlistan los AA que conforman a 6aJL2, y en la tercera columna el número de enlaces $^1\text{H}^{\text{N}}-^{15}\text{N}$ presentes en las cadenas laterales.

En el Anexo III se muestran las estructuras de los 20 aminoácidos

Sin embargo solo se observan 22 señales $^1\text{H}^{\text{N}}, ^{15}\text{N}$ de cadena lateral. Esto se debe a que las señales pueden estar traslapadas. Por otro lado, ya que la secuencia de 6aJL2 tiene seis prolinas, que no presentan enlace $^1\text{H}^{\text{N}}-^{15}\text{N}$ en la cadena principal (Tabla 3.2), se esperaría asignar 105 sistemas de espín

AA	En la secuencia de 6aJL2	Total
Prolina, Pro, P 	P7, P14, P41, P45, P56, P60	6

Tabla 3.2. Número de prolinas presentes en la secuencia de 6aJL2. Como se observa en la estructura del AA; al formar el enlace peptídico, se pierde el enlace $^1\text{H}^{\text{N}}-^{15}\text{N}$ de cadena principal y no es posible observar señales en ^{15}N HSQC.

Las cuatro señales restantes que se observan en ^{15}N HSQC poseen correlación con Cα (Figura 3); pero no se logró secuenciarlas. Las ocho señales $^1\text{H}^{\text{N}}, ^{15}\text{N}$ que no se observan, deben estar traslapadas al igual que en el caso anterior. Esto puede remediarse utilizando un equipo con un mayor campo magnético.

Considerando que no se tiene la totalidad de la asignación y que se trata del mismo dominio variable 6aJL2 con una mutación al inicio de la secuencia (PRO7SER), este 90% de semejanza indica que la estructura secundaria de 6aJL2 y 6aJL2(P7S) es la misma. Así que se utilizará la estructura de 6aJL2(P7S), obtenida por Difracción de Rayos X (Dra. Rodríguez. Comunicación Directa), para señalar los residuos que presentaron diferencias en el desplazamiento químico entre el dominio variable 6aJL2 y 6aJL2(R25G).

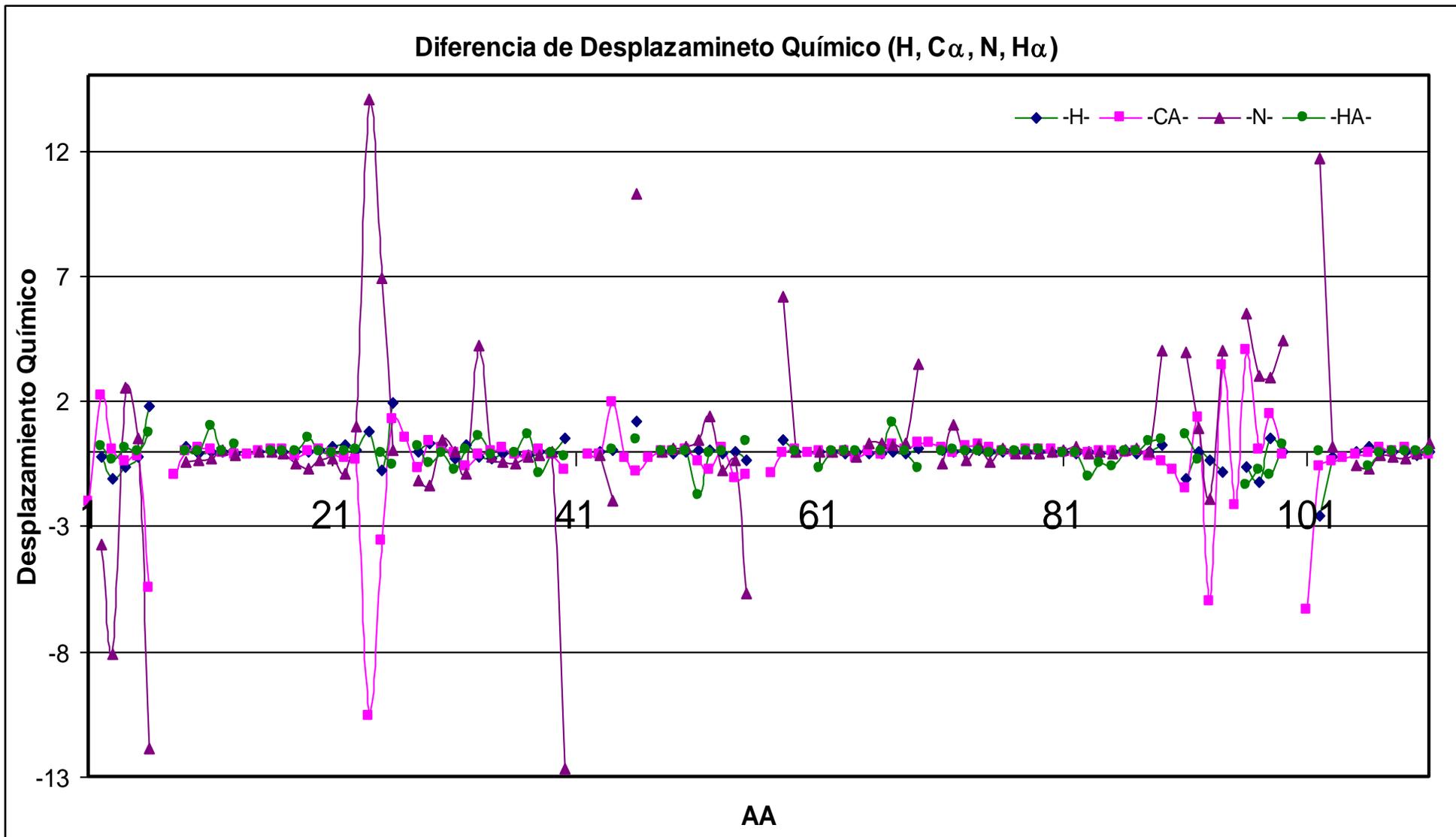
Los residuos de 6aJL2 y 6aJL2(R25G) que presentan diferencias en el desplazamiento químico son los que están involucrados en los cambios conformacionales de la estructura terciaria. Dichos cambios conformacionales se originan por la mutación ARG 24 GLY y son los que promueven la fibrilación.

Así que se graficó la diferencia en el desplazamiento químico que presenta cada átomo de $^{15}\text{N}^{\text{H}}$, $\text{C}\alpha$, $^1\text{H}^{\text{N}}$ y $^1\text{H}\alpha$ de los 111 aminoácidos de 6aJL2 y 6aJL2(R25G) (Gráfica 3.1)

Entonces se observan zonas bien definidas donde el desplazamiento químico es considerablemente diferente, por lo que se deduce que si 6aJL2 es estable y 6aJL2(R25G) es fibrilogénica, las zonas que presentan diferencias importantes en el desplazamiento químico son las zonas involucradas en la alta fibrilogenicidad de 6aJL2(R25G) ya que se trata de un fenómeno de conformación.

Esta evidencia experimental es pieza clave en la elucidación de cómo se lleva a cabo la fibrilación en inmunoglobulinas, por lo que la deducción propuesta es tema de otros estudios que están fuera del alcance de esta tesis.

La Figura 3.5 es la estructura 3D de 6aJL2(P7S) obtenida por Difracción de Rayos X (Dra. Rodríguez. Comunicación Directa). En color rojo se señala el residuo 25 donde ocurre la mutación Arg 24 Gly de 6aJL2(R25G). En color verde las zonas que presentan cambios conformacionales debidas a dicha mutación, y en color azul los residuos que no presentaron cambios en su conformación y que por tanto, tampoco presentaron diferencia en el desplazamiento químico.



Gráfica 3.1. Diferencia de Desplazamientos Químicos de los núcleos $^1\text{H}^{\text{N}}$, $^{13}\text{C}\alpha$, ^{15}N y $^1\text{H}\alpha$ de 6aJL2 con respecto a 6aJL2R25G, que es una proteína fibrilogénica.

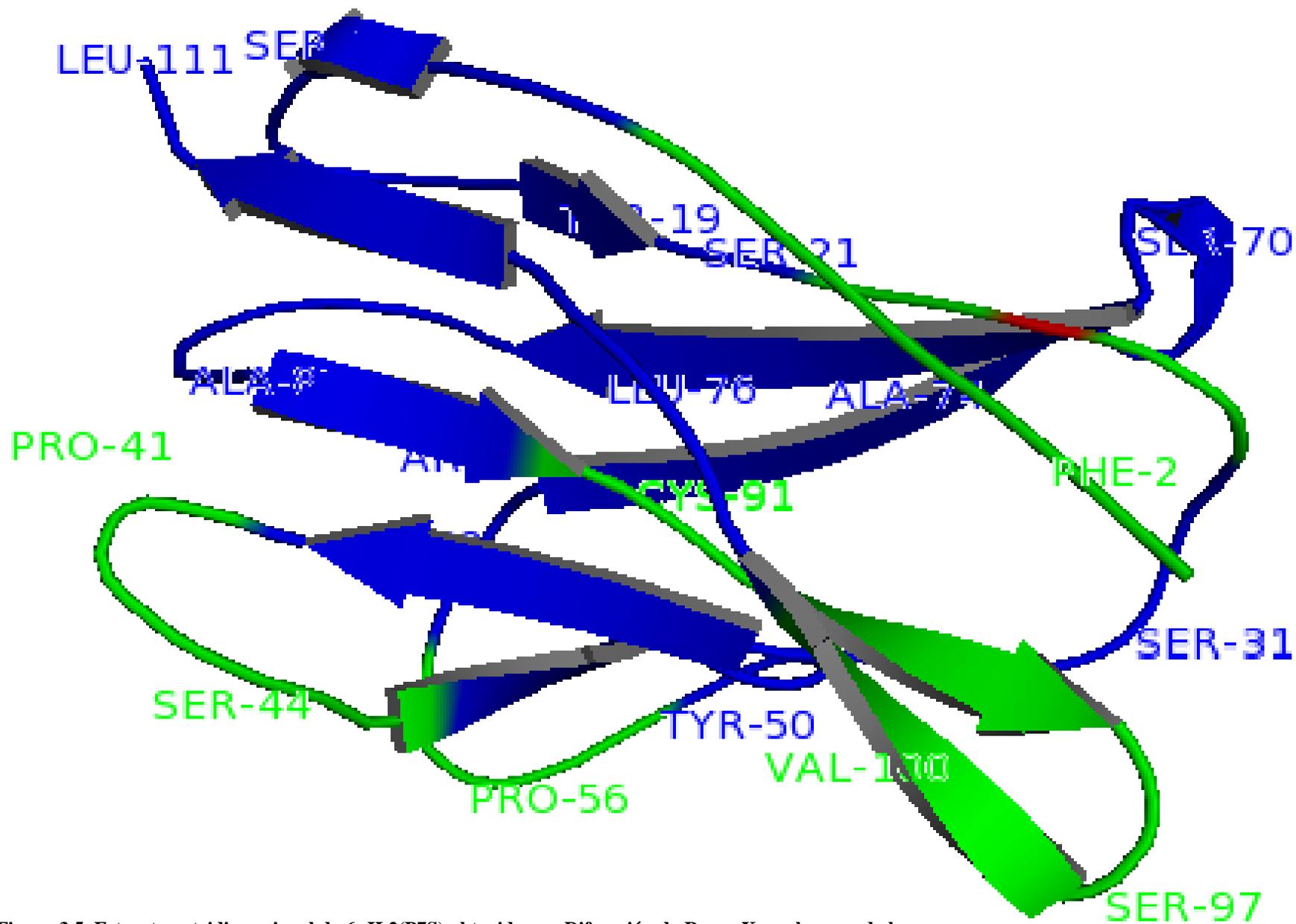
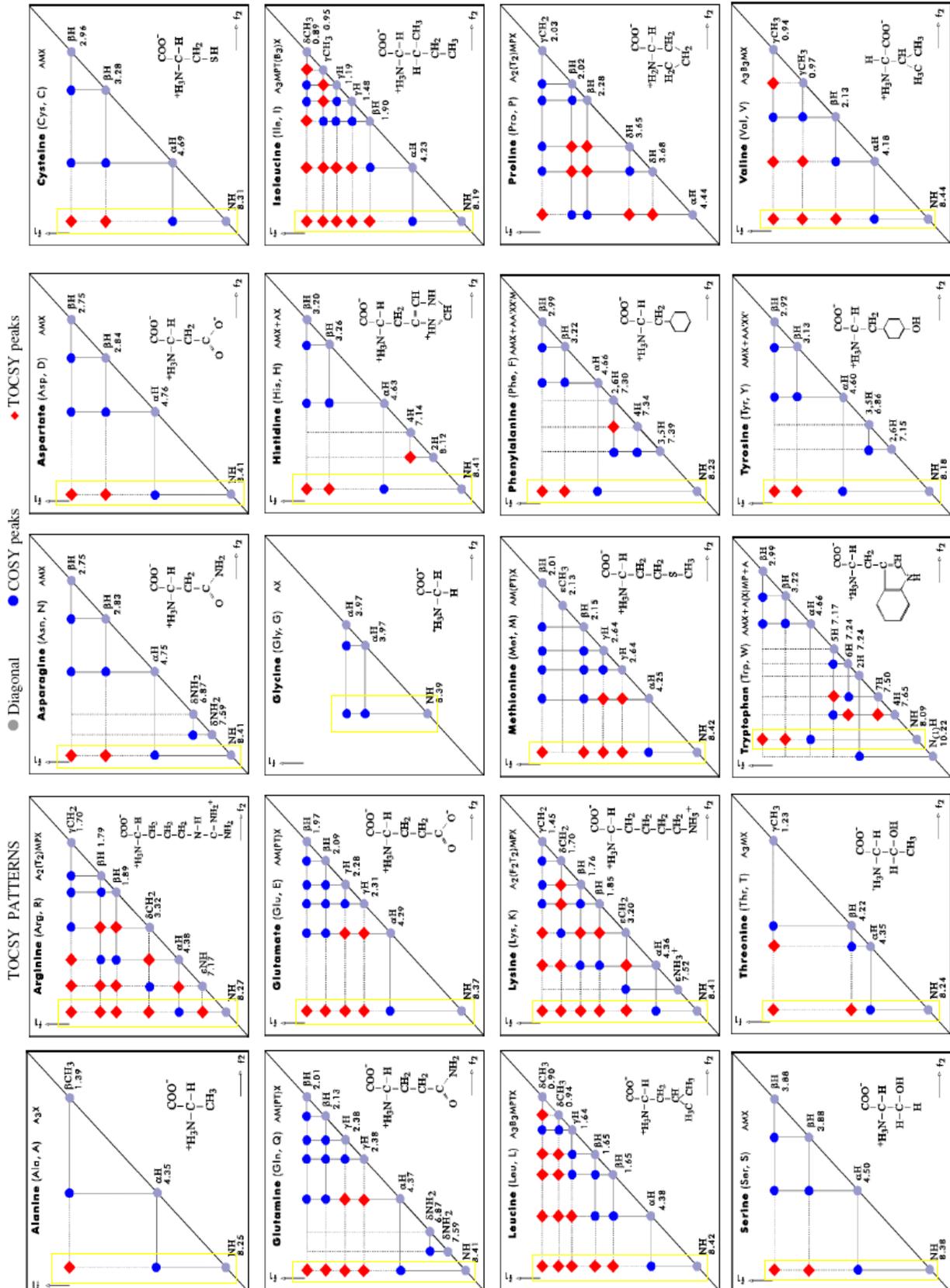


Figura 3.5. Estructura tridimensional de 6aJL2(P7S) obtenida por Difracción de Rayos X en el grupo de la Dra. Rodríguez (Comunicación Directa). De color rojo está la Arginina donde se llevó a cabo la mutación (R25G). En verde están las zonas donde se presentaron cambios importantes en el Desplazamiento Químico de 6aJL2 y 6aJL2(R25G) y en azul las zonas que no se modificaron.

Conclusiones

- Se obtuvieron los espectros
 - ^{15}N HSQC,
 - ^{13}C HSQC,
 - HCCHTOCSY,
 - HNCA y HNCOCA,
 - HNCACB y CBCACONH,
 - HNCACO y HNCO,
 - ^{15}N NOESY HSQC y ^{15}N TOCSY HSQC.
- Se escribieron y optimizaron los textos de procesamiento (nmrPipe) para cada tipo de espectro.
- Se asignó el 90% de la proteína 6aJL2.
- Se estimó la estructura secundaria de 6aJL2 (CSI) y se comparó con la estructura de 6aJL2(P7S) obtenida por Difracción de rayos X (Dra. Rodríguez. Comunicación Directa). Resultó ser la misma en un 90%.
- La asignación de 6aJL2 se comparó con la de 6aJL2(R25G)
- Se identificaron zonas donde la conformación de 6aJL2 y 6aJL2(P7S) es diferente. Dichas zonas son las involucradas en la fibrilación.

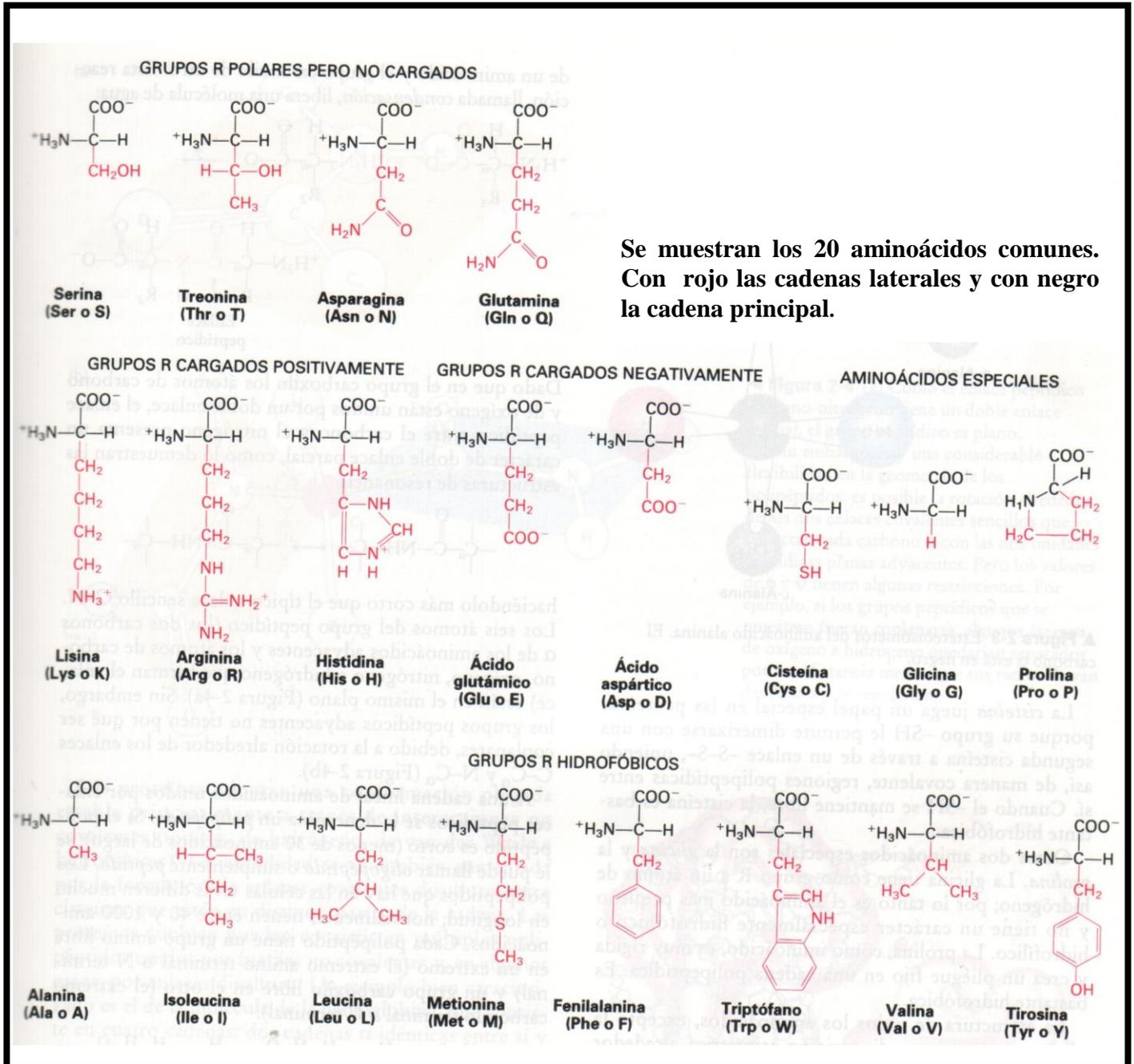
Señales TOCSY de cada aminoácido



Patrones de señales TOCSY para cada tipo de Sistema de Espín. Se encierra en un rectángulo amarillo, la columna sobre el $^1\text{H}^N$, que es la que se observa en ^{15}N TOCSY HSQC.

Anexo II

Estructura de los 20 aminoácidos más comunes



Anexo III

Tabla de Desplazamientos Químicos de 6aJL2

No	AA	Núcleo	δ (ppm)	No	AA	Núcleo	δ (ppm)	No	AA	Núcleo	δ (ppm)
1	N	CA	54.631	10	V	HB	1.998	17	T	HG	0.925
1	N	CO	173.922	10	V	HG	0.891	17	T	CA	61.470
2	F	N	119.400	10	V	CA	61.390	17	T	CB	10.990
2	F	H	8.870	10	V	CB	36.360	17	T	CO	173.836
2	F	HA	4.660	10	V	CO	173.492	18	V	N	123.990
2	F	HB	3.624	11	S	N	118.720	18	V	H	8.610
2	F	CA	55.580	11	S	H	8.340	18	V	HA	4.600
2	F	CO	172.015	11	S	HA	4.790	18	V	HB	1.718
3	M	N	116.920	11	S	HB2	3.711	18	V	HG	0.747
3	M	H	8.920	11	S	HB3	3.605	18	V	CA	59.420
3	M	HA	4.690	11	S	CA	56.450	18	V	CB	36.020
3	M	HB	1.951	11	S	CB	65.990	18	V	CO	172.375
3	M	CA	54.030	11	S	CO	173.191	19	T	N	119.730
3	M	CB	36.110	12	E	N	123.730	19	T	H	8.150
3	M	CO	175.469	12	E	H	8.260	19	T	HA	4.590
4	L	N	122.720	12	E	HA	4.600	19	T	HB	3.660
4	L	H	8.670	12	E	HB2	1.611	19	T	HG	0.968
4	L	HA	4.560	12	E	HB3	1.815	19	T	CA	61.380
4	L	CA	53.180	12	E	HG	2.578	19	T	CB	11.680
4	L	CB	43.330	12	E	CA	54.780	19	T	CO	173.320
4	L	CO	176.050	12	E	CB	35.330	20	I	N	127.460
5	T	N	117.400	12	E	CO	174.309	20	I	H	9.230
5	T	H	9.000	13	S	N	119.340	20	I	HA	4.050
5	T	HA	4.810	13	S	H	9.730	20	I	HG1	1.428
5	T	HB	4.038	13	S	HA	4.610	20	I	HG2	1.227
5	T	HG	0.568	13	S	HB2	3.985	20	I	CA	61.070
5	T	CA	61.690	13	S	HB3	3.617	20	I	CB	40.730
5	T	CB	10.490	13	S	CA	57.920	20	I	CO	174.051
5	T	CO	174.450	13	S	CB	63.010	21	S	N	120.000
6	Q	N	113.350	13	S	CO	171.085	21	S	H	7.620
6	Q	H	7.410	14	P	CA	63.822	21	S	HA	5.410
6	Q	HA	4.610	14	P	CB	31.817	21	S	HB	3.862
6	Q	HB	2.919	14	P	CO	177.747	21	S	CA	57.990
6	Q	CA	57.830	15	G	N	112.010	21	S	CB	66.210
6	Q	CO	173.284	15	G	H	10.130	21	S	CO	173.521
8	H	CA	60.137	15	G	HA	3.990	22	C	N	120.710
8	H	CB	30.960	15	G	CA	45.000	22	C	H	8.680
8	H	CO	177.188	15	G	CO	174.781	22	C	HA	5.140
9	S	N	110.760	16	K	N	121.070	22	C	HB2	3.113
9	S	H	7.930	16	K	H	7.230	22	C	HB3	2.800
9	S	HA	5.380	16	K	HA	4.500	22	C	CA	55.600
9	S	HB2	4.766	16	K	HB	1.938	22	C	CO	174.218
9	S	HB3	3.882	16	K	CA	55.030	23	T	N	122.770
9	S	CA	57.440	16	K	CB	32.500	23	T	H	9.330
9	S	CB	65.500	16	K	CO	174.352	23	T	HA	4.610
9	S	CO	172.589	17	T	N	115.400	23	T	HB	3.942
10	V	N	120.430	17	T	H	8.080	23	T	HG	1.255
10	V	H	8.660	17	T	HA	5.390	23	T	CA	63.160
10	V	HA	4.470	17	T	HB	3.858	23	T	CB	10.820

No	AA	Núcleo	δ (ppm)	No	AA	Núcleo	δ (ppm)	No	AA	Núcleo	δ (ppm)
23	T	CO	176.844	31	S	HB3	3.841	39	Q	CA	54.920
24	R	N	129.390	31	S	CA	60.980	39	Q	CB	31.650
24	R	H	8.530	31	S	CB	64.120	39	Q	CO	175.082
24	R	HA	5.170	31	S	CO	173.522	40	R	N	118.670
24	R	HB	2.031	32	N	N	116.490	40	R	H	8.490
24	R	HG1	2.512	32	N	H	7.230	40	R	HA	4.790
24	R	HG2	1.326	32	N	HA	4.630	40	R	CA	55.460
24	R	CA	55.800	32	N	HB	2.467	40	R	CO	178.818
24	R	CB	31.930	32	N	CA	52.790	42	G	CA	46.025
24	R	CO	173.989	32	N	CB	44.010	42	G	CO	174.223
25	S	N	123.890	32	N	CO	172.718	43	S	N	114.970
25	S	H	9.200	33	Y	N	121.210	43	S	H	7.980
25	S	HA	4.780	33	Y	H	8.680	43	S	HA	5.030
25	S	HB	4.227	33	Y	HA	4.360	43	S	HB2	3.994
25	S	CA	61.690	33	Y	HB2	2.293	43	S	HB3	3.801
25	S	CB	63.010	33	Y	HB3	2.152	43	S	CA	57.020
25	S	CO	174.455	33	Y	CA	58.140	43	S	CB	63.340
26	S	N	114.640	33	Y	CO	178.435	43	S	CO	173.148
26	S	H	6.960	34	V	N	126.180	44	S	N	114.750
26	S	HA	4.690	34	V	H	9.520	44	S	H	8.390
26	S	HB	3.922	34	V	HA	4.690	44	S	HA	4.500
26	S	CA	57.710	34	V	HB	2.031	44	S	HB2	4.062
26	S	CB	64.550	34	V	HG	1.358	44	S	HB3	3.765
26	S	CO	174.455	34	V	CA	61.940	44	S	CA	55.930
27	G	CA	44.381	34	V	CB	33.510	44	S	CO	174.217
27	G	CO	172.503	34	V	CO	174.237	45	P	CA	63.865
28	S	N	114.150	35	Q	N	125.370	45	P	CO	175.804
28	S	H	8.480	35	Q	H	8.770	46	T	N	127.570
28	S	HA	4.770	35	Q	CA	53.580	46	T	H	8.030
28	S	CA	57.050	35	Q	CB	45.850	46	T	HA	4.300
28	S	CO	177.403	35	Q	CO	174.311	46	T	HB	4.123
29	I	N	129.630	36	W	N	117.340	46	T	HG	0.543
29	I	H	9.210	36	W	H	9.170	46	T	CA	61.540
29	I	HA	4.720	36	W	HA	5.590	46	T	CO	174.684
29	I	HB	1.765	36	W	CA	55.820	47	T	CA	65.083
29	I	HD	0.717	36	W	CO	175.770	47	T	CB	69.094
29	I	HG	0.968	37	Y	N	119.660	47	T	CO	174.914
29	I	CA	60.590	37	Y	H	9.720	48	V	N	121.260
29	I	CB	39.290	37	Y	HA	4.850	48	V	H	9.040
29	I	CO	173.621	37	Y	CA	56.380	48	V	HA	4.480
30	A	N	120.480	37	Y	CO	171.085	48	V	HB2	0.794
30	A	H	7.480	38	Q	N	122.650	48	V	HB3	0.549
30	A	HA	4.490	38	Q	H	9.440	48	V	HG	2.608
30	A	HB	1.263	38	Q	HA	5.220	48	V	CA	62.200
30	A	CA	51.790	38	Q	CA	53.930	48	V	CB	33.530
30	A	CB	18.710	38	Q	CB	34.720	48	V	CO	172.675
30	A	CO	177.859	38	Q	CO	174.051	49	I	N	116.610
31	S	N	113.480	39	Q	N	128.270	49	I	H	7.330
31	S	H	7.850	39	Q	H	9.550	49	I	HA	5.140
31	S	HA	4.790	39	Q	HA	4.880	49	I	HB2	1.981
31	S	HB2	4.002	39	Q	HB	1.832	49	I	HG	0.783

No	AA	Núcleo	δ (ppm)	No	AA	Núcleo	δ (ppm)	No	AA	Núcleo	δ (ppm)
49	I	CA	56.420	59	V	H	7.520	67	I	N	121.390
49	I	CB	41.420	59	V	HA	4.370	67	I	H	8.540
49	I	CO	175.039	59	V	HB	2.097	67	I	HA	3.660
50	Y	N	123.260	59	V	HG	1.054	67	I	HB	1.952
50	Y	H	9.490	59	V	CA	60.350	67	I	HD	0.842
50	Y	HA	5.200	59	V	CB	33.270	67	I	CA	59.360
50	Y	HB2	2.804	60	P	CO	176.544	67	I	CB	39.790
50	Y	HB3	3.123	60	P	CA	63.459	67	I	CO	175.039
50	Y	CA	54.830	60	P	CB	33.531	68	D	N	125.910
50	Y	CO	172.503	61	D	N	119.400	68	D	H	9.180
51	E	N	116.540	61	D	H	8.550	68	D	HA	5.080
51	E	H	9.240	61	D	HA	4.770	68	D	HB	2.875
51	E	HA	4.810	61	D	HB2	4.110	68	D	CA	52.340
51	E	HB	3.782	61	D	HB3	3.562	68	D	CB	42.270
51	E	CA	57.810	61	D	CA	55.540	68	D	CO	176.243
51	E	CB	33.100	61	D	CB	39.620	69	S	N	125.170
51	E	CO	176.372	61	D	CO	175.727	69	S	H	9.100
52	D	N	113.680	62	R	N	114.760	69	S	HA	4.800
52	D	H	8.970	62	R	H	6.710	69	S	CA	61.490
52	D	HA	4.200	62	R	HA	4.070	70	S	CA	61.659
52	D	HB	2.574	62	R	HB2	1.951	70	S	CO	175.233
52	D	CA	60.060	62	R	HB3	1.770	71	S	N	113.950
52	D	CO	178.306	62	R	CA	57.080	71	S	H	7.410
53	N	N	115.250	62	R	CB	29.500	71	S	HA	4.600
53	N	H	8.800	62	R	CO	174.094	71	S	CA	57.800
53	N	HA	4.490	63	F	N	120.040	71	S	CB	64.120
53	N	HB2	2.641	63	F	H	7.730	71	S	CO	174.649
53	N	HB3	3.250	63	F	HA	4.820	72	N	N	124.680
53	N	CA	52.950	63	F	HB2	2.364	72	N	H	8.110
53	N	CB	39.960	63	F	HB3	3.035	72	N	HA	4.480
53	N	CO	176.233	63	F	CA	57.810	72	N	HB2	2.514
54	Q	N	120.660	63	F	CB	40.390	72	N	HB3	1.971
54	Q	H	8.710	63	F	CO	174.652	72	N	CA	53.910
54	Q	CA	55.660	64	S	N	114.770	72	N	CB	39.700
54	Q	CB	16.560	64	S	H	8.930	72	N	CO	173.277
54	Q	CO	172.475	64	S	HA	4.750	73	S	N	109.130
55	R	N	116.830	64	S	HB	3.682	73	S	H	8.150
55	R	H	8.940	64	S	CA	57.380	73	S	HA	5.600
55	R	HA	4.720	64	S	CB	65.750	73	S	HB	3.671
55	R	HB	1.951	64	S	CO	172.375	73	S	CA	56.690
55	R	HD	2.717	65	G	N	110.030	73	S	CB	68.320
55	R	CA	53.980	65	G	H	8.850	73	S	CO	171.730
55	R	CO	175.414	65	G	CA	43.910	74	A	N	125.280
57	S	CA	61.189	65	G	CO	172.546	74	A	H	9.280
57	S	CO	177.440	66	S	N	113.020	74	A	HA	5.390
58	G	N	119.270	66	S	H	8.710	74	A	HB	1.726
58	G	H	8.250	66	S	HA	4.800	74	A	CA	50.070
58	G	HA	3.700	66	S	HB	3.834	74	A	CB	24.020
58	G	CA	45.370	66	S	CA	57.430	74	A	CO	176.715
58	G	CO	174.566	66	S	CB	66.020	75	S	N	114.220
59	V	N	124.310	66	S	CO	173.191	75	S	H	8.980

No	AA	Núcleo	δ (ppm)	No	AA	Núcleo	δ (ppm)	No	AA	Núcleo	δ (ppm)
75	S	HA	5.710	82	K	CA	54.160	90	Y	CB	39.958
75	S	HB	3.432	82	K	CB	36.620	91	C	N	121.130
75	S	CA	57.790	82	K	CO	177.618	91	C	H	8.710
75	S	CB	66.610	83	T	N	116.300	91	C	HA	4.360
75	S	CO	171.644	83	T	H	8.850	91	C	CA	54.710
76	L	N	127.720	83	T	HA	4.770	91	C	CB	28.900
76	L	H	8.400	83	T	HB	3.814	91	C	CO	174.124
76	L	HA	4.400	83	T	CA	67.050	92	Q	N	122.400
76	L	HB2	1.391	83	T	CO	177.360	92	Q	H	8.590
76	L	HB3	0.793	84	E	N	118.270	92	Q	HA	5.140
76	L	CA	52.490	84	E	H	8.850	92	Q	HB2	1.788
76	L	CB	41.350	84	E	HA	4.790	92	Q	HB3	1.607
76	L	CO	174.781	84	E	HB	2.171	92	Q	CA	53.130
77	T	N	124.510	84	E	CA	58.410	92	Q	CB	33.270
77	T	H	9.070	84	E	CB	28.730	92	Q	CO	175.633
77	T	HA	4.970	84	E	CO	175.459	93	S	N	118.130
77	T	HB	3.605	85	D	N	119.730	93	S	H	9.030
77	T	HG	0.879	85	D	H	8.140	93	S	HA	0.000
77	T	CA	61.550	85	D	HA	5.160	93	S	CA	61.780
77	T	CB	10.630	85	D	HB	2.931	93	S	CO	174.438
77	T	CO	173.062	85	D	CA	55.030	94	Y	N	126.360
78	I	N	127.040	85	D	CB	40.900	94	Y	H	9.400
78	I	H	8.730	85	D	CO	177.526	94	Y	HB	2.908
78	I	HA	4.200	86	E	N	121.790	94	Y	CA	52.680
78	I	HB	1.249	86	E	H	7.550	95	D	CA	54.030
78	I	HD	0.847	86	E	HA	4.120	95	D	CO	175.383
78	I	CA	60.230	86	E	HB	2.232	96	S	N	118.080
78	I	CB	39.530	86	E	CA	59.180	96	S	H	9.060
78	I	CO	175.168	86	E	CB	30.020	96	S	HA	5.580
79	S	N	121.390	86	E	CO	174.996	96	S	CA	56.740
79	S	H	8.550	87	A	N	126.450	96	S	CB	21.520
79	S	HA	4.730	87	A	H	8.120	96	S	CO	176.908
79	S	CA	56.540	87	A	HA	4.410	97	S	N	121.100
79	S	CB	64.640	87	A	HB	1.076	97	S	H	9.400
79	S	CO	173.866	87	A	CA	51.840	97	S	HA	5.280
80	G	N	110.300	87	A	CB	20.330	97	S	CA	57.550
80	G	H	7.780	87	A	CO	174.598	97	S	CO	175.297
80	G	HA2	3.656	88	D	N	117.470	98	N	N	117.730
80	G	HA3	3.375	88	D	H	7.680	98	N	H	7.760
80	G	CA	47.340	88	D	HA	5.150	98	N	HA	5.130
80	G	CO	174.469	88	D	HB2	3.124	98	N	HB	3.499
81	L	N	117.160	88	D	HB3	2.920	98	N	CA	53.530
81	L	H	8.010	88	D	CA	53.920	98	N	CO	173.629
81	L	HA	3.770	88	D	CO	177.504	99	H	N	121.440
81	L	HB	1.440	89	Y	N	122.650	99	H	H	8.510
81	L	CA	56.690	89	Y	H	8.720	99	H	HA	4.770
81	L	CB	43.990	89	Y	HA	5.250	99	H	CA	54.730
81	L	CO	176.801	89	Y	HB	3.218	101	V	CA	67.145
82	K	N	125.370	89	Y	CA	57.190	101	V	CB	0.000
82	K	H	9.110	90	Y	CO	176.191	101	V	CO	173.535
82	K	HA	4.910	90	Y	CA	58.021	102	F	N	118.980

No	AA	Núcleo	δ (ppm)	No	AA	Núcleo	δ (ppm)	No	AA	Núcleo	δ (ppm)
102	F	H	8.860	106	T	CA	61.200	109	T	HA	4.560
102	F	HA	4.980	106	T	CB	13.560	109	T	HB	3.976
102	F	CA	58.240	106	T	CO	173.664	109	T	HG	1.126
102	F	CO	178.607	107	K	N	128.780	109	T	CA	61.500
103	G	N	109.760	107	K	H	8.300	109	T	CB	11.390
103	G	H	9.130	107	K	HA	4.860	109	T	CO	172.460
103	G	CA	45.120	107	K	HB	1.671	110	V	N	126.200
103	G	CO	174.523	107	K	HG	1.335	110	V	H	8.890
104	G	CA	46.672	107	K	CA	56.290	110	V	HA	4.870
104	G	CO	175.254	107	K	CB	32.500	110	V	HB	2.019
105	G	N	105.980	107	K	CO	174.910	110	V	HG2	0.760
105	G	H	7.030	108	L	N	133.690	110	V	HG3	0.750
105	G	HA2	3.981	108	L	H	8.950	110	V	CA	61.190
105	G	HA3	3.328	108	L	HA	5.430	110	V	CB	32.160
105	G	CA	45.550	108	L	HD	0.750	110	V	CO	175.426
105	G	CO	172.260	108	L	CA	54.100	111	L	N	134.140
106	T	N	119.200	108	L	CB	44.460	111	L	H	8.170
106	T	H	8.080	108	L	CO	175.899	111	L	HA	4.070
106	T	HA	5.340	109	T	N	122.640	111	L	CA	57.050
106	T	HB	3.938	109	T	H	8.690	111	L	CB	44.070
								111	L	CO	181.701

Apéndice A

Conceptos Básicos

Desplazamiento químico (δ)

Se le conoce como desplazamiento químico a la frecuencia en la que un núcleo, expuesto a un campo magnético B_0 , está en resonancia con la frecuencia de Larmor, que es la frecuencia asociada a la diferencia de energía, ΔE , necesaria para pasar de un estado energético a otro.

Así, el desplazamiento químico es una frecuencia que es ligeramente diferente, entre el mismo tipo de núcleo, a la frecuencia de Larmor, ello debido a las contribuciones de los momentos magnéticos de núcleos vecinos. Esta ligera diferencia está medida en relación de una frecuencia de referencia.

El compuesto de referencia para biopolímeros es comúnmente un derivado de tetrametilsilicio soluble en agua, por ejemplo el propanoato de 3-trimetilsilicio (TSP) o el Sulfonato de 2,2-dimetil, 2-silipentano (DSS).

En unidades de frecuencia (Hertz), el desplazamiento químico es proporcional al campo magnético aplicado B_0 . Para evitar que la medida de desplazamiento químico dependa de B_0 , se expresa en partes por millón (ppm):

$$\delta(ppm) = 10^6 \times \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{ref}}$$

Donde ν es la frecuencia del vector de RMN en estudio y ν_{ref} es la frecuencia del compuesto de referencia.

Entonces, el valor de δ sólo depende de la estructura química que presente la molécula en estudio.

Constante de acoplamiento espín – espín (J)

La constante de acoplamiento caracteriza la interacción escalar (a través de enlaces) entre núcleos que están unidos por uno, dos o más enlaces covalentes en una estructura química. J es un campo magnético independiente que se expresa comúnmente en Hertz (Hz).

El **Efecto Nuclear Overhauser (NOE)** es un cambio fraccional de la intensidad en un vector de RMN cuando otra resonancia es irradiada en un experimento de doble irradiación. Los NOE's son consecuencia de interacciones dipolares (a través del espacio) entre diferentes núcleos y son

inversamente proporcionales a la sexta potencia de la distancia internuclear. Los NOE's son expresados en por ciento de la intensidad de resonancia no perturbada.

Coherencia

En el estado de equilibrio, las componentes x , y de la magnetización neta, \mathbf{M} , son igual a cero. Sin embargo, al aplicarle un pulso de rf sobre el eje x ó y , se genera una *magnetización transversal*. En mecánica cuántica esta magnetización transversal está descrita como el resultado de la presencia de coherencia en la muestra. A continuación se describe el fenómeno.

Al equilibrio no existe magnetización transversal. Pero, como ya hemos visto, ya que los dos niveles de energía (α y β) no tienen la misma población de espines; existe una magnetización en el eje z ($n_\alpha - n_\beta$).

Esto se puede describir como una polarización de la muestra en dirección del eje z . Cuando un pulso de rf es aplicado, se genera una magnetización en el eje y , la magnitud de esta magnetización es proporcional a la polarización original sobre z . Si no existe polarización en el eje z al tiempo cero ($n_\alpha = n_\beta$), es decir; si la muestra no está expuesta a un campo magnético B_0 al inicio del experimento, entonces el pulso no generará magnetización en el eje y . Así, lo que debe quedar claro es que el pulso sólo rota la magnetización en el eje z al eje y (*magnetización transversal*).

La magnetización transversal se describe como el resultado de la coherencia entre los espines. También se dice que la coherencia es una “alineación de los espines”, la cual es provocada por el pulso de rf , al ser aplicado sobre el eje x , a una muestra cuya polarización está originalmente sobre el eje z .

Es importante que cada espín experimente el mismo pulso de rf , si éste es el caso; entonces cada espín rotará su polarización, por lo que la magnitud promedio de la polarización en el eje y , será igual a la inicial en el eje z .

Orden de Coherencia

La magnetización, \mathbf{M} , se puede describir como un vector con componentes (x, y, z) que además, tiene un movimiento rotatorio. Para facilitar su estudio se utiliza como herramienta el producto de operadores.

El orden de coherencia, que se representa con el símbolo p , está definido como el suceso que le ocurre al operador, o producto de operadores, cuando se aplica una rotación sobre z con un ángulo Φ . Si como resultado de esta rotación, el operador adquiere la fase $(-p \times \Phi)$, entonces el operador es de orden p .

$$\hat{\rho}^{(p)} \xrightarrow{\text{rotación}_\phi\text{ con respecto a } z} \hat{\rho}^{(p)} x \exp(-ip\phi)$$

Donde $\hat{\rho}^{(p)}$ es un operador de orden p .

El orden sólo puede tener valor de número entero, positivo o negativo, incluyendo cero. Un operador con p igual a ± 1 es de coherencia cuántica simple. Mientras que un operador con p igual a ± 2 posee coherencia cuántica doble y así sucesivamente. Así mismo, los operadores con p igual a cero son cuántica cero o magnetización en z .

Entonces, un estado de coherencia de orden $+1$ rota $-\Phi$; mientras un estado de coherencia de orden $+2$ rotará -2Φ .

Eco de Espín

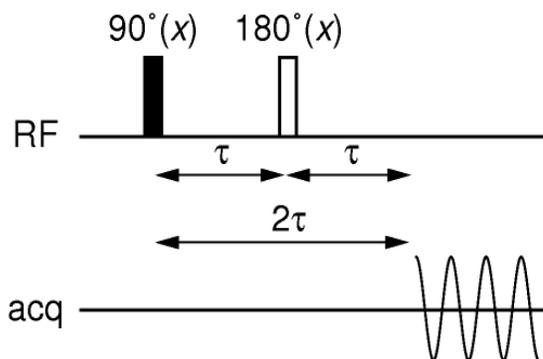


Figura 1. Secuencia de pulsos de un Eco de Espín. El pulso de 180° , indicado con el rectángulo en blanco, está en el centro de un periodo de duración 2τ , esto separa la secuencia en dos periodos iguales, τ , antes de la adquisición. El rectángulo de color negro indica el pulso inicial de 90° .

Esta secuencia es un componente importante en la gran mayoría de los experimentos complejos. Su importancia radica en que, al final de su aplicación, la magnetización termina sobre el eje en el que había comenzado. Ello a pesar de la duración que pueda tener τ o del tamaño del offset Ω . Entonces se dice que “el offset ha sido reenfocado”, lo que significa que al final de esta secuencia, es como si la magnetización no hubiera evolucionado del todo; como si el *offset* fuera igual a cero.

Pulsos de 180° como pulsos de reenfoque

Para entender cómo trabaja la secuencia de pulsos de eco de espín, primero habrá que explicar la función de un pulso de 180° cuando es aplicado a una magnetización transversal. En la siguiente figura se describe de manera gráfica el proceso (Figura 2):

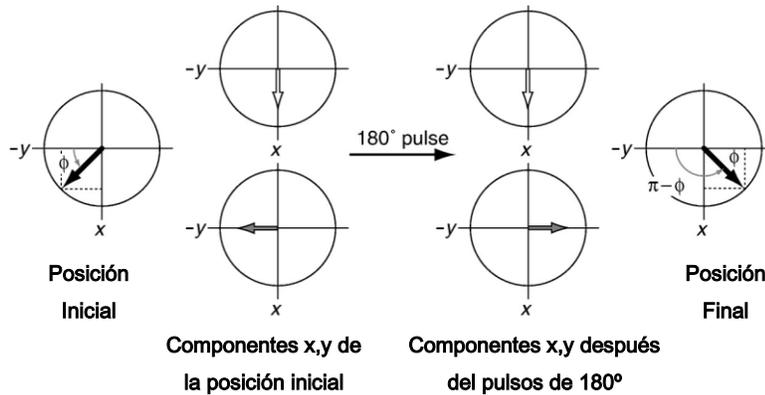


Figura 2. Diagrama que muestra la evolución del vector, que se encuentra en el plano xy , al aplicarle un pulso de 180° sobre x . El resultado es la imagen especular de la posición inicial

En la posición inicial del diagrama anterior, un vector de magnetización ha precesado, su posición está definida por el ángulo Φ con respecto a $-y$. Como se observa en esta figura, la componente en x no se afecta al aplicar el pulso de 180°, ello debido a que está alineada con el pulso que se está aplicando sobre este eje. Sin embargo, la componente en y rota 180°, esto provoca que la posición final sea la imagen especular de la anterior.

Expresado en términos del ángulo de fase, el efecto del pulso de 180° sobre el eje x , es mover la posición del vector, descrita por Φ con respecto a $-y$, a $\pi - \Phi$.

Función del Eco de Espín

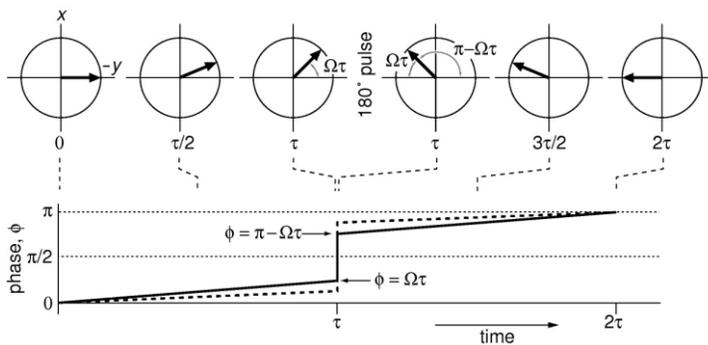


Figura 3. Diagrama que muestra la evolución de un eco de espín. Al inicio, la magnetización se encuentra sobre el eje $-y$, después de un tiempo τ , precesa en dirección opuesta a las manecillas del reloj. Al aplicar un pulso de 180°, se origina una imagen especular de dicho vector. Finalmente vuelve a precesar en la misma dirección, provocando que la magnetización quede sobre el eje y .

La Figura 3 muestra el movimiento típico de un vector de magnetización durante el eco de espín. El diagrama comienza después del pulso inicial de 90° sobre x , que provoca que la magnetización esté sobre el eje $-y$. Luego se muestra la posición del vector de magnetización al tiempo $\tau/2$ y τ , dicha posición es el ángulo, Φ , con respecto al eje $-y$. Como ya se ha explicado anteriormente, el pulso de 180° cambia de posición al vector, ahora está $\pi - \Phi$ con respecto al eje $-y$. Sin embargo, con respecto al eje y , está posición es Φ . Nuevamente precesa en dirección de las manecillas del reloj un τ . Así, la posición actual es:

$$(\pi - \Phi) + \Phi = \pi$$

Es decir, el vector de magnetización está sobre el eje y . Se dice que el vector se ha reenfocado ya que no importa el valor de Φ , el vector de magnetización al final estará ubicado sobre y .

Reenfoque

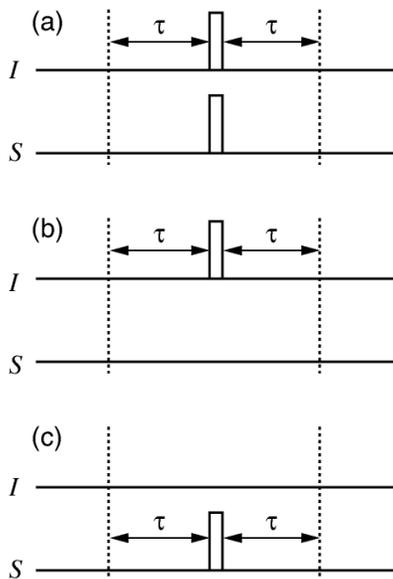


Figura 4. Tres diferentes secuencias de ecos de espín que son aplicadas en sistemas heteronucleares. (a) El pulso de 180° se aplica a ambos núcleos. (b) solo al núcleo I, que es protón, y (c) solo al núcleo S, que representa a un heteronúcleo. La secuencia (a) da el mismo resultado que un eco de espín homonuclear; el desplazamiento químico es reenfocado y el acoplamiento no. En (b) se reenfoca sólo el desplazamiento químico del núcleo I, así como el acoplamiento. En la secuencia (c) se reenfoca acoplamiento y el desplazamiento químico de S.

Evidentemente, es posible aplicar dos pulsos con suficientemente potencia, tal que uno afecte a los ^1H 's y el otro a ^{13}C 's. Es decir, un pulso fuerte puede cubrir todo el rango de desplazamiento químico de ^{13}C sin afectar a los protones y viceversa.

Cuando se utilizan ecos de espín en sistemas heteronucleares, se decide a qué tipo de núcleos afectará el pulso de 180° . En un sistema de dos tipos de núcleos, existen tres posibilidades (Figura 4); En la secuencia (a) se aplica a ambos núcleos, entonces el desplazamiento químico es reenfocado tanto para el

núcleo I como para S, mientras que el acoplamiento evoluciona durante el tiempo 2τ . En las secuencias (b) y (c), se reenfoca desplazamiento químico de sólo uno de los núcleos y el acoplamiento en ambos casos. I, representa al protón y S al heteroátomo.

INEPT

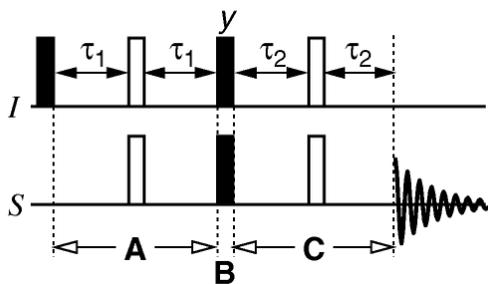


Figura 5. Secuencia de pulsos del experimento INEPT. El segundo pulso de 90° del núcleo I se aplica sobre y. El resultado final es una señal observable del núcleo S, cuyo tamaño (sensibilidad) depende de la magnitud de polarización del núcleo I. Como la constante giromagnética, γ , del núcleo I es mayor que γ del heteroátomo S (^{13}C ó ^{15}N), la señal observada de S será mayor que si se adquiere con una secuencia sencilla homonuclear. La secuencia trabaja generando un estado de antifase en el núcleo I durante el periodo A. Este estado de antifase es transferido al núcleo S usando los dos pulsos de 90° en el periodo B. Durante el periodo C, el estado de antifase es reenfocado y puesto en fase; entonces es observado.

Para llevar a cabo la explicación del experimento INEPT, se utilizará producto de operadores. No ahondaremos en cómo se obtienen tales expresiones porque está fuera de nuestro estudio. Sólo las usaremos para facilitar la explicación.

Los espines I, S tienen diferente constante giromagnética, el vector de magnetización que los define posee una magnitud diferente. Por tanto, definiremos al vector del espín I como $k_I \hat{I}_z$, donde k_I es un parámetro que determina la magnitud del vector \hat{I} (constante giromagnética). Entonces, el vector del espín S, se escribe $k_S \hat{S}_z$.

Comenzaremos diciendo que el pulso de 90° sobre el espín I, provoca que la magnetización rote, $-k_I \hat{I}_z$. El periodo A es un eco de espín aplicado a ambos espines; así el desplazamiento químico de I y S es reenfocado y el acoplamiento evoluciona durante un tiempo 2τ . Entonces, al final del periodo A, el estado del sistema de espín es:

$$k_I \cos(2\pi J_{IS} \tau_1) \hat{I}_y - k_I \sin(2\pi J_{IS} \tau_1) 2 \hat{I}_x \hat{S}_z$$

El periodo B consiste en dos pulsos de 90° . El pulso en I se aplica sobre el eje y, estos son los pulsos que causan la transferencia de coherencia. El orden en el cual actúan no importa ya que están en diferentes tipos de espín. El operador \hat{I}_y no es afectado por ninguno de los dos pulsos de 90° , por lo que no se transfiere coherencia en este término. Entonces podemos descartarlo ya que si no se transfiere coherencia; no contribuirá en la señal del espín S, que será la que observaremos al final del experimento.

El término $2\hat{I}_x\hat{S}_z$ es afectado por los dos pulsos:

$$-k_I \text{sen}(2\pi J_{IS}\tau_1) 2\hat{I}_x\hat{S}_z \xrightarrow{(\frac{\pi}{2})\hat{I}_y} k_I \text{sen}(2\pi J_{IS}\tau_1) 2\hat{I}_z\hat{S}_z \xrightarrow{(\frac{\pi}{2})\hat{S}_x} -k_I \text{sen}(2\pi J_{IS}\tau_1) 2\hat{I}_z\hat{S}_y$$

Estos dos pulsos han transferido la magnetización en antifase del espín I al espín S. El periodo C es un eco de espín que, al igual que en el periodo A, reenfoca el desplazamiento químico de I y S y permite que el acoplamiento evolucione. Entonces, al final de este periodo se tiene:

$$-k_I \cos(2\pi J_{IS}\tau_2) \text{sen}(2\pi J_{IS}\tau_1) 2\hat{I}_z\hat{S}_y + k_I \text{sen}(2\pi J_{IS}\tau_2) \text{sen}(2\pi J_{IS}\tau_1) \hat{S}_x$$

El valor de \hat{S}_x es el más grande, cuando el seno de $2\pi J_{IS}\tau_1$ es igual a uno, esto se logra cuando el argumento del seno es $\pi/2$:

$$2\pi J_{IS}\tau_1 = \frac{\pi}{2}$$

Ello sugiere que si τ_1 es igual a $1/4J_{IS}$, se tendrá la señal más grande. El valor óptimo para τ_2 es también éste. Entonces, con $\tau_{1,2} = 1/4J_{IS}$, el término final observable es:

$$k_I \hat{S}_x$$

Mientras que con una secuencia de pulsos sencilla obtendríamos $-k_S \hat{S}_y$, y como se sabe, $k_S < k_I$.

Mezclado Isotrópico

La parte medular de la secuencia de pulsos del experimento TOCSY, es el periodo de mezclado isotrópico. En un sistema de dos espines; el periodo de mezclado isotrópico causa la evolución de la magnetización en el eje z. Esto se describe a continuación mediante funciones trigonométricas y producto de operadores:

$$\hat{I}_{1z} \rightarrow \frac{1}{2} [1 + \cos(2\pi J_{12}\tau_{mix})] \hat{I}_{1z} + \frac{1}{2} [1 - \cos(2\pi J_{12}\tau_{mix})] \hat{I}_{2z} - \text{sen}(2\pi J_{12}\tau_{mix}) \frac{1}{2} (2\hat{I}_{1y}\hat{I}_{2x} - 2\hat{I}_{1x}\hat{I}_{2y})$$

El aspecto importante en esta ecuación es que la magnetización en el eje z del espín uno, \hat{I}_{1z} , es transferida a la magnetización en z del espín dos, \hat{I}_{2z} , en una proporción que depende del acoplamiento y del tiempo de mezclado, τ_{mix} . Esta es la transferencia que provoca los picos de cruce en el espectro.

En la práctica, el mezclado isotrópico es aplicado usando secuencias de pulsos diseñadas especialmente, por ejemplo la DIPSI-2. Estas secuencias se conforman de colecciones de pulsos elegidos cuidadosamente que poseen varias fases y ángulos. Son secuencias que se aplican repetidamente para obtener el resultado deseado.

Se le llama “isotrópica” ya que no sólo se transfiere magnetización sobre eje z, también puede transferir aquella que esté alineada a los ejes $-x-$ ó $-y-$, siempre y cuando los espines estén acoplados. Por ejemplo, la evolución de la magnetización sobre x, durante un periodo de mezclado isotrópico, puede deducirse de la ecuación anterior haciendo la permutación cíclica de z a x, x a y y ya z como sigue:

$$\hat{I}_{1x} \rightarrow \frac{1}{2}[1 + \cos(2\pi J_{12}\tau_{mix})]\hat{I}_{1x} + \frac{1}{2}[1 - \cos(2\pi J_{12}\tau_{mix})]\hat{I}_{2x} - \text{sen}(2\pi J_{12}\tau_{mix})\frac{1}{2}(2\hat{I}_{1z}\hat{I}_y - 2\hat{I}_{1y}\hat{I}_{2z})$$

Apéndice B

NMRPipe

NMRPipe es una colección de programas base LINUX que se utilizan para el procesamiento y análisis de espectros multidimensionales. Las herramientas de este paquete son operadas usando interfases gráficas y UNIX *shell scripts*, que llamaremos textos de procesamiento. Esto permite que sean extremadamente flexibles.

Para este trabajo se utilizaron dos de los programas de los que se compone el paquete NMRPipe; NMRPipe, en donde es posible cambiar el formato de los datos obtenidos en el equipo y procesarlos.

NMRDraw, que es una interfase gráfica que permite utilizar la mayoría de las herramientas del paquete; realizar un procesamiento interactivo, editar el texto de procesamiento (script), verificar los datos en el dominio del tiempo, en la fase de tiempo real, detección de picos automática y análisis de espectros.

El programa de procesamiento NMRPipe es la parte central de un sistema de herramientas para la manipulación y análisis de espectros multidimensionales, ello mediante el uso de *pipes* (tubería) en UNIX. Para realizar esta tarea, se utilizan una sucesión de funciones, por ejemplo; Transformada de Fourier en una dimensión, que se aplican a los datos obtenidos en el equipo.

También se utilizan programas de datos de entrada (input) y de salida (output) como *xyz2pipe* y *pipe2xyz* para construir esquemas completos de procesamiento de datos multidimensionales con los que se obtienen espectros en dos y tres dimensiones.

Los textos de procesamiento (shell-scripts) pueden ser contruidos con un editor de textos sobre LINUX o en la interfase gráfica nmrDraw. En este caso, se utilizó el editor de textos *vi* y la interfase gráfica nmrDraw.

Así, el procesamiento de los datos obtenidos en un equipo de RMN, en este caso marca Varian Inova, requiere los siguientes pasos:

- Cambio de formato de los datos obtenidos en el equipo de RMN (FID).
- Verificar los datos del dominio de tiempo
- Procesamiento de baja resolución
- Análisis del resultado del proceso
- Procesamiento completo de alta resolución

Cambio de formato de los datos obtenidos en el equipo (FID)

Los datos que se obtienen del equipo son números binarios en el dominio del tiempo (FID), así que estos son convertidos a un formato tipo nmrPipe; con una organización uniforme de puntos reales e imaginarios. Ello mediante la interfase de conversión interactiva Varian, que lee el archivo *procp* y automáticamente extrae los parámetros de adquisición, que previamente se definieron en el equipo (Figura B.1). Una vez extraídos, se crea un texto de procesamiento, *fid.com*, con las modificaciones que se hayan hecho a los parámetros, éste se muestra en la ventana Conversion Script Text de la Figura B.1. Sin embargo no siempre funcionan adecuadamente y se requiere optimizarlos.

Verificar los datos del dominio de tiempo

Una vez creado el texto de procesamiento *fid.com*, es posible realizar los cambios desde el editor de textos *vi*. Así, los parámetros de adquisición pueden ser manipulados en la interfase gráfica de nmrDraw (Figura B.1) o desde el texto de procesamiento, *fid.com*, que se crea al ejecutar *procp*.

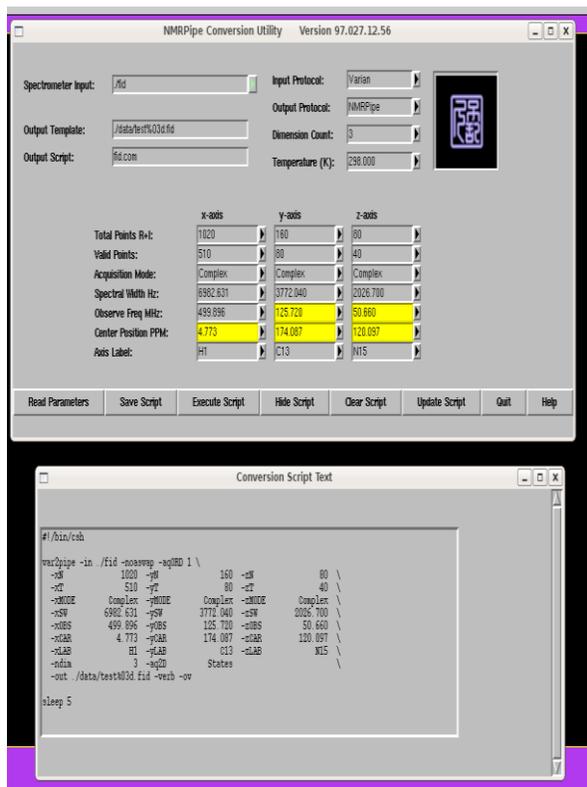


Figura B.1. Interfase gráfica NMRDraw donde, mediante la opción *procp* (Proc), se accede a la ventana *NMRPipe conversion Utility*. En esta ventana es posible leer los parámetros de adquisición, modificarlos, y salvarlos como script. Dicho script se nombró *fid.com* y se muestra en la ventana Conversión Script Text. Es posible ejecutar este script desde esta interfase gráfica o en el editor de textos *vi*. Cabe mencionar que este script es para un experimento 3D.

A continuación se transcribe, del editor de textos *vi*, el texto de procesamiento *fid.com* para un espectro en dos dimensiones:

```
#!/bin/csh
```

```
var2pipe -in ./fid -noaswap \
-xN 2048 -yN 512 \
```

```

-xT      1024 -yT      256 \
-xMODE   Complex -yMODE   Complex \
-xSW     6999.738 -ySW     1723.300 \
-xOBS    499.896 -yOBS    50.660 \
-xCAR    4.773 -yCAR    120.096 \
-xLAB    H1 -yLAB    N15 \
-ndim    2 -aq2D    States \
-out ./test.fid -verb -ov

```

sleep 5

shell script siempre comenzará con la línea:

```
#!/bin/csh
```

Después se escribe el comando de entrada, donde se especifica el nombre del archivo que se va a convertir (FID):

```
var2pipe -in ./fid -noaswap \
```

Al final el comando de salida, donde se asigna un nombre al archivo que contiene los datos convertidos:

```
-out ./test.fid -verb -ov
```

Es importante notar que en la línea del texto donde está el nombre del archivo de entrada, *./fid*, también está el comando del programa *var2pipe*, este programa será el que lleve a cabo la conversión. Después de esta línea se incluye la lista de parámetros específicos para cada eje, los cuales tienen un valor para cada dimensión en los datos de entrada.

Es importante decir que existen parámetros de conversión que soportan opciones especiales para esquemas de adquisición complejas, incluyendo datos que aumentan la sensibilidad (Rance-Kay/Echo:Anti-Echo).

La nomenclatura de *nmrPipe* usa los términos *-Xaxis*, *-Yaxis*, *-Zaxis* para referirse a las dimensiones de los datos. Análogamente, el comando de conversión *var2pipe* usa los prefijos *-x*, *-y*, *-z*. Por ejemplo, el ancho de barrido está especificado con los nombres *-xSW*, *-ySW* y *-zSW*.

El comando de conversión debe incluir las especificaciones de los siguientes parámetros para cada dimensión:

Modo de Adquisición

Este parámetro define el tipo de datos que se encuentran en cada dimensión; controla qué parte, real o imaginaria, debe ser procesada y qué parte almacenada. El modo de adquisición es especificado usualmente con una palabra. Existen muchas posibles palabras que pueden ser utilizadas; en la mayoría de los casos es suficiente especificar si se trata de números reales, *Real*, o complejos, *Complex*. Los modos de adquisición son especificados con las opciones `-xMODE`, `-yMODE` y `-zMODE`.

`-xMODE` `Complex` `-yMODE` `Complex \`

Tamaño Actual

Este parámetro especifica el número total de puntos (reales + imaginarios) almacenados en el archivo de entrada (FID) para cada dimensión. En la mayoría de los casos (por ejemplo cuando detecta números complejos) este valor es el doble del que corresponde al tamaño del dominio del tiempo. Este parámetro está especificado con los parámetros `-xN`, `-yN` y `-zN`.

`-xN` `2048` `-yN` `512 \`

Tamaño Válido del Dominio del Tiempo

Este parámetro especifica el número de puntos válidos, grabados en el archivo de entrada, para cada dimensión. Entonces, si la dimensión posee números complejos; el total de puntos en el dominio de tiempo deberá ser la suma de un punto por cada número complejo.

`-xT` `1024` `-yT` `256 \`

Ventana Espectral

Este parámetro define el intervalo, en Hertz, que se observa en cada dimensión, ventana espectral

`-xSW` `6999.738` `-ySW` `1723.300 \`

Este parámetro define la frecuencia de Larmor en MHz, a la que se observa cada dimensión

```
-xOBS      499.896 -yOBS      50.660 \
```

Tipo de átomo que es observa

```
-xLAB      H1 -yLAB      N15 \
```

Número de dimensiones del experimento y número de dimensiones en las que se adquirirá el espectro.

```
-ndim      2 -aq2D      States \
```

Procesamiento de baja resolución

Una vez que se ejecuta el texto de procesamiento *fid.com*, y que se ha obtenido el archivo *text.fid*, se le aplican un par de operaciones sobre la primera dimensión, *x*, (cosine-bell, fourier transform). De esta forma, es posible ver el espectro de la primera dimensión sobre la interfase gráfica nmrDraw (Figura B.2). Así, mediante la asignación de valores numéricos a P_0 y P_1 (Figura B.2); el espectro se pone en fase manualmente. Es importante no olvidar estos valores, ya que se retomarán más adelante.

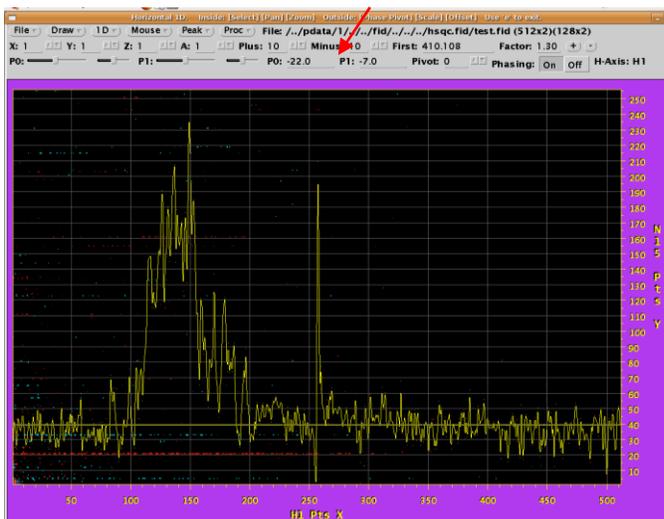


Figura B.2. Ventana de la interfase visual nmrDraw, se observa la primera dimensión de un espectro 2D. Las señales se ponen en fase manualmente usando p_0 y p_1 .

Análisis del resultado del proceso

Al igual que para la conversión de los datos es posible crear un texto de procesamiento en la interfase de NMRDraw con todas las operaciones necesarias para crear un espectro de n dimensiones (Figura B.2).

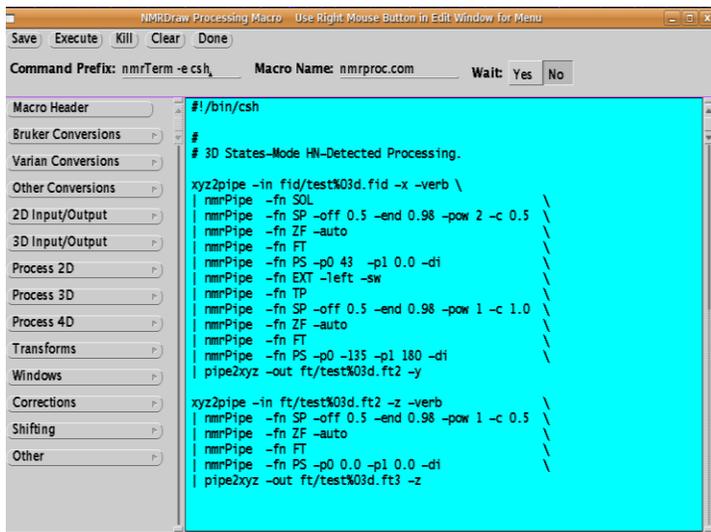


Figura B.3. Ventana en la interfase gráfica nmrDraw, donde es posible diseñar un texto de procesamiento para manipular un archivo *test.fid* de n dimensiones, en este caso se trata de un experimento en 3 dimensiones .

Una vez que se ha creado, es posible manipularlo en el editor de textos vi. A continuación se transcribe el texto de procesamiento para un espectro de dos dimensiones.

```
#!/bin/csh
#
# Basic 2D Phase-Sensitive Processing:
# Cosine-Bells are used in both dimensions.
# Use of "ZF -auto" doubles size, then rounds to power of 2.
# Use of "FT -auto" chooses correct Transform mode.
# Imaginaries are deleted with "-di" in each dimension.
# Phase corrections should be inserted by hand.

nmrPipe -in /test.fid \
#| nmrPipe -fn SOL \
| nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 1.00 -pow 1 -c 1.0 \
| nmrPipe -fn ZF -auto \
| nmrPipe -fn FT -auto \
| nmrPipe -fn PS -p0 174.6 -p1 -50.0 -di -verb \
```

```

| nmrPipe -fn EXT -left -sw          \
| nmrPipe -fn TP                    \
| nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 1.00 -pow 1 -c 1.0 \
| nmrPipe -fn ZF -auto              \
| nmrPipe -fn FT -auto              \
#| nmrPipe -fn POLY -auto          \
| nmrPipe -fn PS -p0 0.0 -p1 0.0 -di -verb \
#| nmrPipe -fn POLY -auto          \
  -ov -out /test.ft2

```

Así que el valor de p0 y p1 obtenidos para la primera dimensión, se copian en el texto de procesamiento. Este se ejecuta y se crea un nuevo archivo test.ft2. Si se trata de un espectro 2D, el archivo test.ft2 es el espectro aún sin optimizar, si es un espectro 3D; el archivo test.ft2 es una proyección del plano xy. El archivo test.ft2 es nuevamente manipulado sobre la ventana de nmrDraw y ahora se arregla la fase de la segunda dimensión manualmente (Figura B.3).

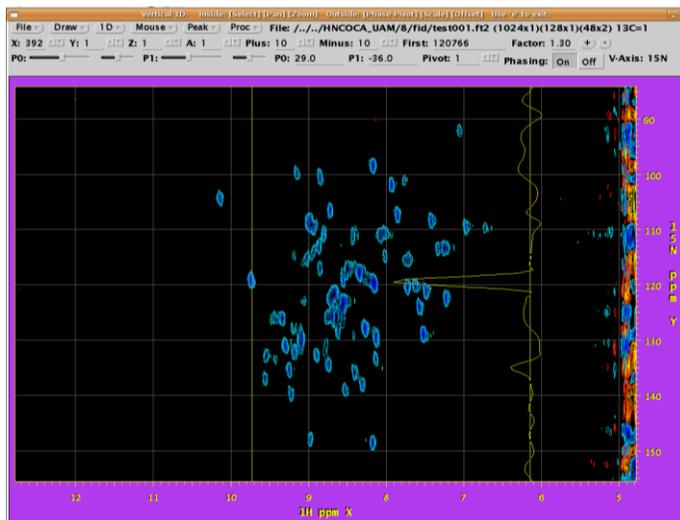


Figura B.3. Ventana de la interfase gráfica nmrDraw. Se muestra la proyección del plano xy (^1H , ^{15}N) del espectro HNCOCA. El cursor vertical permite que se arregle la fase de ^{15}N .

Se utiliza el comando xyz2pipe, cuando se trata de un espectro de tres dimensiones y xy2pipe, cuando se trata de 2D. Si se manipulan espectros de tres dimensiones, es conveniente ejecutar tres textos de procesamiento; dos donde se procesen las proyecciones de cada plano (xy y xz), una vez que se hayan optimizado ambos textos de procesamiento; se copia cada una de las operaciones utilizadas en cada uno a un tercer texto de procesamiento que contiene el comando xyz2pipe y entonces se obtiene el espectro 3D. En seguida se describe este texto de procesamiento y se explica cada operación.

Cuando se usan comandos nmrPipe para procesar datos experimentales, que previamente han sido convertidos mediante var2pipe, es necesario especificar la siguiente información:

1. Localización del archivo de entrada
2. Serie de operaciones que se aplicarán
3. Parámetros para cada operación
4. Destino del archivo de salida

El símbolo, #, indica salto de línea. Los símbolos posteriores se consideran comentarios. Es decir, las líneas marcadas con # no se leen y por tanto no se aplican al archivo de entrada.

Todas las funciones, para aplicar operaciones, pueden ser seleccionadas usando `-fn`, *fnNombre del argumento*. Estas operaciones se aplican sólo a la primera dimensión y pueden estar acompañadas de parámetros que es necesario especificar, por ejemplo;

```
| nmrPipe -fn FT -auto \
```

En la línea anterior se aplica una transformada de Fourier, el parámetro `-auto`, indica que es una transformada de Fourier aplicada a números complejos. Podríamos especificar que se aplique sólo a los reales, `-real`.

El símbolo, /, es usado al final de cada renglón para indicar que la línea continúa en el siguiente. Al final, el argumento `-out nombre del archivo de salida`, es usado para especificar que el archivo de salida deberá ser guardado bajo ese nombre.

Como ya se ha dicho; la línea de pipes se aplica a la primera dimensión de los datos. Para que las siguientes funciones sean aplicadas a una segunda dimensión, es necesario aplicar primero la función TP. La función TP, permite que los planos de la segunda dimensión sean los que se lean del archivo de entrada.

Entonces,

```
nmrPipe -in /adriana/fids/test.fid \
```

`-in` Indica la localización del archivo de entrada

```
| nmrPipe -fn SOL \
```

SOL (Solvent) Se le conoce como filtro de disolvente. Aplica una función de convolución en el dominio del tiempo para sustraer la señal del disolvente.

```
| nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 1.00 -pow 1 -c 1.0 \
```

SP (Adjustable Sine Bell) Multiplica los datos por una curva senoidal

```
| nmrPipe -fn ZF -auto \
```

ZF (Zero Fill) Rellena los espacios vacíos con ceros.

```
| nmrPipe -fn FT -auto \
```

FT (Fourier Transform) Aplica una transformada de Fourier

```
| nmrPipe -fn PS -p0 174.6 -p1 -50.0 -di -verb \
```

PS (Phase Correct) Corrige la línea base

```
| nmrPipe -fn EXT -left -sw \
```

EXT (Extract Region) Limita la zona de interés acortando la ventana espectral visible.

```
| nmrPipe -fn TP \
```

TP (Transpose) $XY \rightarrow YX$ Cambia los renglones, X, y las columnas Y de los planos de entrada

```
| nmrPipe -fn POLY -auto \
```

LP (Linear Prediction) Predice o reemplaza datos del inicio, del final o del interior del archivo de entrada.

SHUF (Shuffle Data) Intercambia datos reales e imaginarios, también reordena y separa operaciones.

POLY (Polynomial Subtract) Sustraer un polinomio del dominio del tiempo o del dominio de la frecuencia.}

-ov **~out** /test.ft2

Escribe el archivo de salida

La información aquí reportada se obtuvo del tutorial en línea (<http://spin.niddk.nih.gov/NMRPipe/>)

Apéndice C

Interpretación de Espectros 3D

RMN Tridimensional

La interpretación de espectros se realizó en el programa CARA 1.8. El tutorial de este programa se encuentra en línea (<http://www.cara.ethz.ch/Wiki/Tutorials>). A continuación se describen las herramientas generales para la manipulación de espectros 3D.

Una vez que los espectros están en formato .param, es posible abrir un proyecto sobre CARA 1.8. Ahí se monta la secuencia y los espectros (Figura C.1).

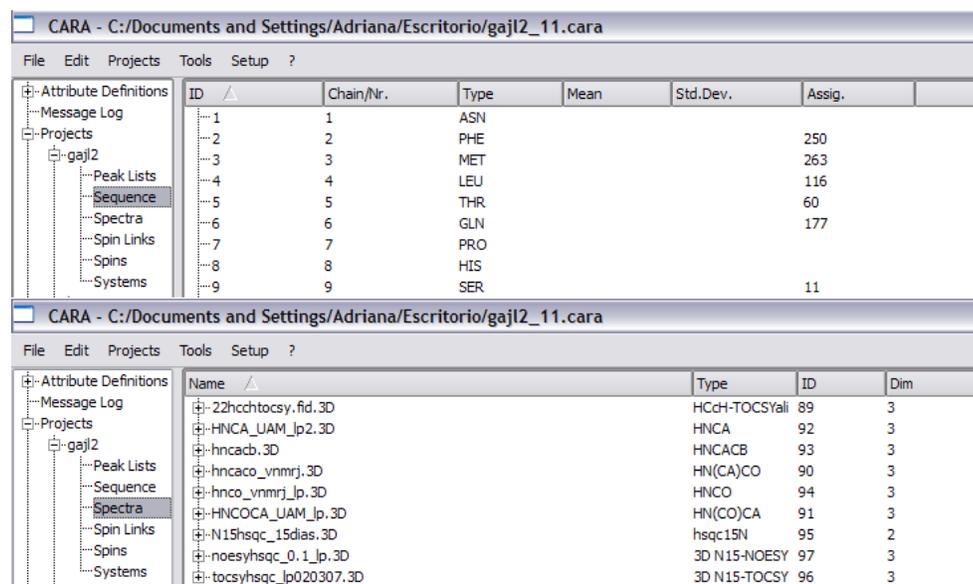


Figura C.1. Ventana principal del programa CARA 1.8. En la parte superior se muestra en la opción secuencia, y en la inferior la lista de espectros montados.

Una vez que se han montado los espectros; es posible verlos en varios tipos de ventanas. En este caso se utilizaron cuatro:

MonoScope

En *MonoScope* se observan las dos dimensiones de un espectro 2D.

Sin embargo, cuando se trata de un espectro 3D, se navega por los planos que se desee. Esto es, el espectro 3D se representa como un cubo el cual se divide sobre una dimensión (por lo regular la de ^{15}N), entonces se observan los planos de ^1H , ^{13}C . Será posible asignar señales y crear listas de picos.

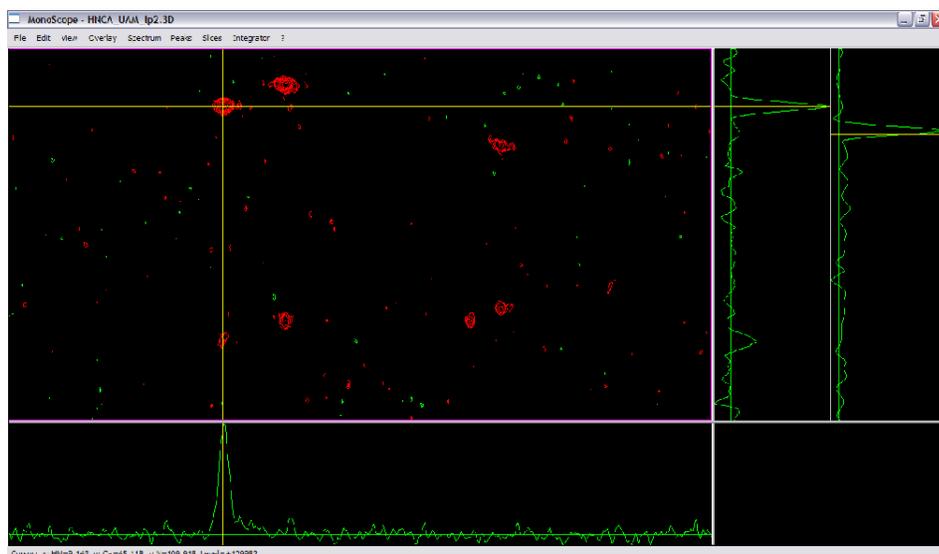


Figura C.2. En este tipo de ventana es posible observar los planos del experimento utilizando las teclas -fp- (forward plane) ó -bp- (back plane).

SynchroScope

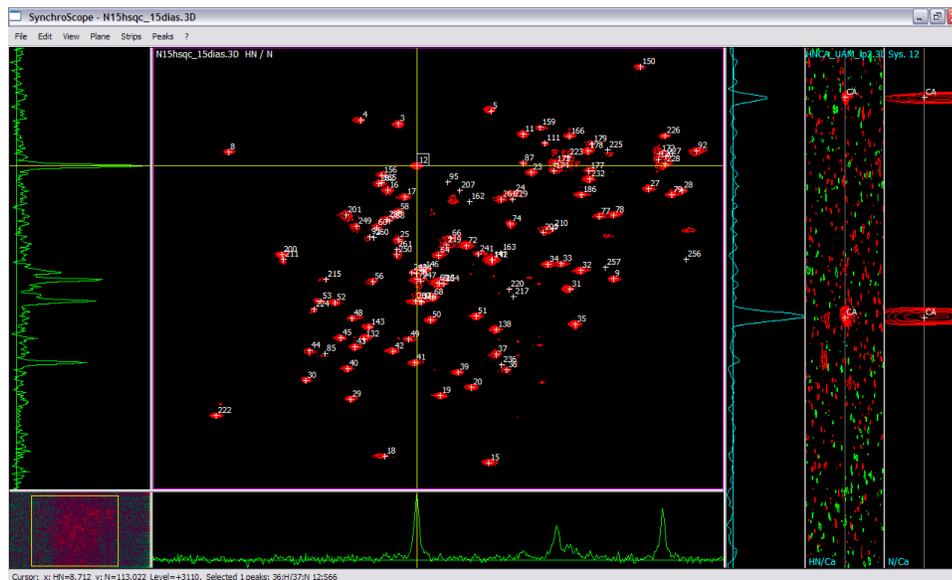


Figura C.3. Ventana SynchroScope, donde es posible observar, simultáneamente, un espectro 2D y uno 3D.

Esta ventana permite la manipulación simultánea de espectros 2D y 3D. En la ventana mayor, se abre el espectro 2D (^{15}N HSQC) y en la franja del lado derecho (ventana menor), un espectro 3D (HNCA), que posea también las dimensiones ($^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N). Si seleccionamos una señal sobre la ventana mayor, en la ventana menor aparecerá la franja del plano donde están las señales de ^{13}C asociadas al $^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N seleccionado.

Así, será posible seleccionar cada espectro 3D y asignar el tipo de núcleo para cada sistema de espín.

StripScope

Esta es una herramienta para llevar a cabo la asignación heteronuclear del esqueleto de la proteína, así como la secuenciación. Es posible desplegar franjas de varios planos ($^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{13}C) de un espectro 3D simultáneamente, de tal forma que las señales se pueden ligar. Esta es la ventana que se utilizó para reportar la mayoría de las observaciones de este trabajo.

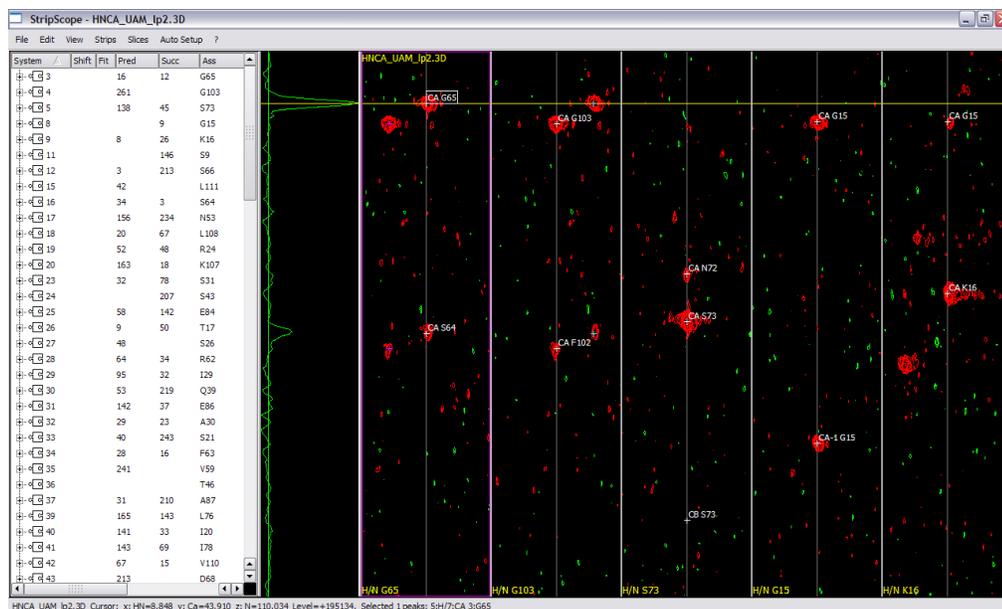


Figura B.4. Ventana StripScope donde se despliegan franjas de distintos planos de un espectro 3D y donde es posible llevar a cabo la secuenciación del esqueleto de la proteína.

PolyScope

Si se abre un espectro 2D sobre PolyScope (^{15}N HSQC), se pueden seleccionar franjas de planos de un espectro 3D, esto funciona exactamente igual que si se trabaja sobre SynchroScope. La ventaja de PolyScope es que las señales no son vistas como coordenadas. PolyScope deduce, sino como conjuntos de señales, sistemas de espín.

Referencias

- Amaro-Estrada I, Olamendi-Portugal T, Ortiz R, Becerril B. Aislamiento de Fragmentos de Anticuerpos (V_{HH}) que reconocen la proteína 6aJL2. Comunicación Directa.
- Bax A, Clore G, Gronenborn M. (1990) J. Magnetic Resonance 88, 425-431
- Bax A, M. Ikura M. (1991) J. Biol. NMR 99-104
- Cavanagh J. (1996) Protein NMR Spectroscopy . Academic Press
- Chávez-Cárdenas M, Cisneros-Armas D, del Pozo-Yauner L, et al. (2002) Mensaje Bioquímico, Vol. XXVI. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, UNAM.
- Delaglio F, Grzesrek S, et al. (1995)NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. J. Biomol NMR, 6. 277-293.
- Del Pozo Yauner L, Ortiz E, Becerril B. 2006. The CDR1 of the Human λ VI Light chains adopts a new Canonical Structure. Proteins: Structure, Function and Bioinformatics 62:122-129 (2006).
- Del Pozo-Yauner L, Ortiz E, Becerril B. Diseases related to protein misfolding. Comunicación Directa.
- Del Río-Portilla F, Ramírez-Cordero B. (2007) Nuclear Magnetic Resonance of proteins. Comunicación Directa.
- Ferentz A, Wagner G. (2000) Reviews of Biophysics 33, I pp.29-65 Cambridge University Press.
- Friebolin H. (1998) Basic One and Two Dimensional NMR Spectroscopy. Wiley-VCH
- Furrer J, Kramer F, Marino J. (2004) J. Magnetic Resonance. 166, 39-46
- Gardner K, Kay L. (1998) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 27, 357-406
- Gutiérrez-González L, Muresanu L, del Pozo-Yauner L. (2007) DOI 10.1007/s12104-007-9045-9
- Hernández-Santoyo A, Rodríguez-Romero A.(2007) Crystal Structure of the Unstable and Highly Fibrillogenic PRO 7 SER Mutant of the Recombinant Variable Domain 6aJL2. PDB.3B56.
<http://spin.niddk.nih.gov/NMRPipe/>
- <http://www.3dnmr.htm>
- <http://www.cara.ethz.ch/Wiki/Tutorials>
- <http://www.ua.fundamento%20tocsy.es>
- Keeler J. (2005) Understanding NMR spectroscopy. John Wiley & Sons. Inglaterra.
- Meissner A, Sorensen O. (2001) J. Magnetic Resonance. 150, 100-104
- Sanders J. (1993) Modern NMR Spectroscopy. 2o Edición. Oxford Univesity Press

Saunders M, Wishnia A, Kirwood J. (1957). J. Am. Chem. Soc. 79, 3289-3290

Stevens P, Raffin R, Hanson D. (1995) Protein Sci 4:421-432

Wüthrich K, Wider G, Wagner G and Braun W. (1982). J. Mol. Biol. 155, 311-319.

Wüthrich K. (1984) Biomed. Res. 5. 151-160

Wüthrich K. (1986) NMR of Proteins and Nucleic Acids. John Wiley & Sons, Inc. USA

Wüthrich K. (1990) J. Biol Chem. 265, 36, 22059-22082

Wüthrich K. (2001) Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley and Sons, Ltd.

Wüthrich K. (2002) Nobel Lecture.

Wüthrich K. 1990. J. Biol. Chem. 265, 22059-22062