

# Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de alta resolución: una herramienta fundamental en Química y Biología Estructural

Manuel Rico

**Resumen:** Se realiza un recorrido histórico sobre los principales desarrollos de la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de alta resolución, a lo largo de sus más de 60 años de existencia, subrayándose sus aplicaciones en Química y Biología, en sus aspectos estructurales y dinámicos. Se presta especial atención a los desarrollos más recientes y a sus perspectivas futuras.

**Palabras clave:** Espectroscopía de RMN, hitos históricos, aplicaciones en Química, aplicaciones en Biología Estructural.

**Abstract:** A historical survey on the main developments in NMR spectroscopy along its more than 60 years of existence is carried out, underlining its structural and dynamic applications in Chemistry and Structural Biology. Especial attention is given to the most recent developments and future perspectives.

**Keywords:** NMR spectroscopy, historical milestones, applications in Chemistry, applications in Structural Biology, recent developments.

## Introducción

Es un hecho ya universalmente reconocido en el mundo científico que la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de alta resolución constituye una de las técnicas de mayor utilidad de las empleadas en Química para la determinación de estructuras moleculares. Las primeras observaciones de transiciones debidas a spines nucleares iban más bien dirigidas al conocimiento del núcleo atómico y, en concreto, a la determinación de propiedades nucleares, tales como la relación giromagnética, una propiedad característica de cada núcleo con spin distinto de cero, que relaciona el momento angular con el momento magnético. Merece la pena recordar el comentario de Félix Bloch (uno de los científicos galardonados, junto con Edward Purcell, con el Premio Nobel de Física de 1952 por la observación de resonancias nucleares) cuando al medir el momento magnético del  $^{14}\text{N}$  utilizando  $\text{NO}_3\text{NH}_4$  para doblar la intensidad de la señal observaron dos señales distintas y descartaron un posible origen nuclear del fenómeno:<sup>1</sup>

“...we are probably dealing with some nasty chemical effect. We shall have to correct for it and get down to real physics...”



M. Rico

Instituto de Química Física, CSIC  
Serrano 119, Madrid 28006  
C-e: [mrigo@iqfr.csic.es](mailto:mrigo@iqfr.csic.es)

Recibido: 13/10/2010. Aceptado: 20/12/2010.

Efectivamente, acababan de descubrirse los desplazamientos químicos, y ahí daban comienzo las aplicaciones en Química de la espectroscopía de RMN.

## Parámetros magnéticos

### Desplazamientos químicos

Los *desplazamientos químicos* son una medida de cómo la frecuencia de resonancia de los spines nucleares se ve afectada por el campo magnético inducido en las posiciones nucleares por su entorno electrónico local. Según la ecuación de Larmor, la frecuencia de resonancia de un núcleo aislado, por ejemplo el protón, depende de su relación giromagnética y del campo magnético externo:

$$\omega_{\text{H}} = \gamma_{\text{H}} \mathbf{B}_0$$

Para un protón  $i$  en una posición dada dentro de una molécula, la ecuación que se aplica es:

$$\omega_{\text{Hi}} = \gamma_{\text{H}} \mathbf{B}_{0i}$$

con  $\mathbf{B}_{0i} = \mathbf{B}_0 (1 - \sigma_i)$ , en donde  $\sigma_i$  se conoce como apantallamiento nuclear, distinto para cada entorno químicamente distinto. Los desplazamientos químicos, una medida de los apantallamientos, constituyen uno de los parámetros magnéticos fundamentales para la obtención de información estructural y dinámica de las moléculas en estudio. Son muy específicos del entorno nuclear y extremadamente sensibles a pequeñas interacciones.

### Acoplamiento spin-spin

Los spines nucleares pueden interactuar entre sí de dos formas principalmente: a través de los electrones de los enlaces, o bien, directamente a través del espacio. En el primer caso, se trata de los acoplamiento escalares cuya medida son las *constantes de acoplamiento*,  $^n\text{J}$ , donde  $n$  es el número de enlaces a través de los que se transmite la interacción. Es bien

conocida la relación de estas constantes con determinados rasgos estructurales, principalmente la muy utilizada relación de Karplus<sup>2</sup> que vincula la constante de acoplamiento vecinal con el ángulo de torsión de enlace. Como veremos más adelante, las constantes de acoplamiento juegan un papel esencial en la transferencia de polarización entre spines en experimentos multidimensionales.

En el segundo caso, se trata de los *acoplamientos dipolares*, cuyo valor depende de la orientación del vector que une a los dos núcleos con respecto a la dirección del campo magnético principal. En medios isotrópicos, los acoplamientos dipolares se promedian a cero, ya que las moléculas en disolución pueden adoptar todas las orientaciones posibles debido a las continuas colisiones originadas por el movimiento browniano. El hecho de que los acoplamientos dipolares se promedien a cero en disolución no impide que jueguen un importante papel en el proceso de relajación nuclear.

### Tiempos de relajación de spin nuclear

La relajación nuclear es el proceso inverso a la excitación. Los núcleos se relajan por transferencia al baño térmico de la energía adquirida en la excitación, que se produce por un mecanismo en el que intervienen principalmente los acoplamientos dipolares. Esta transferencia viene modulada por el movimiento global de la molécula (su tiempo de correlación o de difusión rotacional) o por movimientos de segmentos flexibles dentro de la molécula, de ahí su importancia en el estudio de procesos dinámicos. A efectos operativos, se considera independientemente la velocidad de relajación de la componente longitudinal de la magnetización (en la dirección del campo magnético,  $R_1=1/T_1$ , donde  $T_1$  es el *tiempo de relajación longitudinal*) y la de la componente transversal, en el plano perpendicular al mismo ( $R_2=1/T_2$ , donde  $T_2$  es el *tiempo de correlación transversal*). El efecto Overhauser nuclear (NOE) mide la transferencia de magnetización entre spines nucleares cuando las poblaciones de equilibrio de alguno de ellos son perturbadas. Al producirse esta transferencia por mediación de los acoplamientos dipolares, su intensidad es una función de la distancia (concretamente de  $r_{ij}^{-6}$  donde  $r_{ij}$  es la distancia entre los dos spines). La intensidad del efecto NOE ha constituido y constituye aún la base de la aplicación de la espectroscopía de RMN a la determinación de estructuras tri-dimensionales de biomacromoléculas.

### Un poco de historia

La principal limitación de la espectroscopía de RMN es su baja sensibilidad, lo que es debido a las pequeñas diferencias de energía entre los niveles de spin nuclear, que conduce a que las diferencias entre sus poblaciones, de acuerdo con la distribución de Boltzman, sean muy reducidas. Es por ello por lo que la mayor parte de los esfuerzos han ido dirigidos a mejorar la sensibilidad de la técnica. La vía más directa para ello es la de incrementar la intensidad del campo magnético, puesto que las diferencias de energía de spin nuclear son directamente proporcionales a ella:

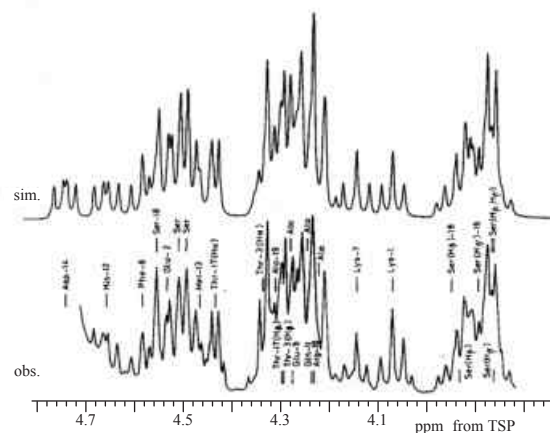
$$\Delta E = \gamma \hbar B_0$$

En los años 60, los imanes que se utilizaban en los espectrómetros eran, o bien electroimanes, o imanes per-

manentes (60-100 MHz para la frecuencia de resonancia del  $^1\text{H}$ ,  $\omega_{\text{H}} = \gamma B_0$ ). A lo largo de la década de los 70, se introdujeron los primeros imanes superconductores, que permitían alcanzar campos magnéticos más y más altos (220-400 MHz).

### Espectroscopía RMN con Transformada de Fourier

Sin embargo, conceptualmente, el desarrollo más importante fue la introducción de la excitación por pulsos de radiofrecuencia (*rf*).<sup>3</sup> La magnetización global de un determinado tipo de spines (la suma de los momentos magnéticos individuales), que, en equilibrio, está alineada en la dirección del campo magnético ( $M_{0z}$ ), se vuelca al plano perpendicular al mismo mediante un pulso de *rf* tal que el producto  $\gamma B_1 t_1$ , en donde  $t_1$  es la duración del pulso y  $B_1$  la intensidad del campo magnético de *rf*, sea igual a  $\pi/2$ . La magnetización se deja evolucionar libremente hasta que se restablece la situación de equilibrio ( $M_z = M_{0z}$  y  $M_{xy} = 0$ ). En su evolución en el plano, la magnetización describe una oscilación, denominada *fid* (caída libre de la magnetización inducida en el receptor) que decae con el tiempo y que se detecta convenientemente. La transformada de Fourier (FT) de la *fid* proporciona el espectro normal en el dominio de frecuencias. Con la utilización, prácticamente universal en esa década, de la espectroscopía RMN por FT se podía incrementar la sensibilidad de la técnica 10-15 veces



**Figura 1.** Arriba: asignación de los protones  $\text{H}_\alpha$  del fragmento N-terminal de 19 residuos de la enzima Ribonucleasa. Abajo: modelo que satisface todas las observaciones respecto a las variaciones espectrales con el pH y la temperatura. La estructura helicoidal coincide con la que el fragmento adopta en la proteína intacta.

para el  $^1\text{H}$  y hasta 40-60 veces para el  $^{13}\text{C}$ , para espectros obtenidos en un mismo intervalo de tiempo.

En esa época, el trabajo de asignación de señales de resonancia a protones concretos de la molécula era un trabajo arduo y muy laborioso. Como una ilustración, se presenta en la Figura 1 (arriba) la asignación de los protones  $\text{H}_\alpha$  y  $\text{H}_\beta$  que aparecen en la zona comprendida entre  $\delta$  3-5 ppm del fragmento N-terminal (19 residuos) de la enzima ribonucleasa de páncreas bovino. A esa asignación pudo llegarse<sup>4</sup> mediante la realización de experimentos individuales de doble resonancia, las variaciones observadas con el pH y con la ayuda del espectro del fragmento de 13 residuos. A partir de las variaciones observadas en el espectro con el pH y la temperatura, fue posible construir el modelo<sup>5</sup> que se presenta en la Figura 1 (abajo), que satisface todas las observaciones procedentes de los espectros de RMN. Consistía en una hélice que se extendía entre los residuos 3-13 y cuya estabilidad se favorecía por dos interacciones de cadenas laterales. Era la primera vez que se observaban poblaciones helicoidales sustanciales en un péptido de ese tamaño y el hallazgo generó un método de determinar estructuras residuales en el estado desplegado de una proteína, mediante el estudio de fragmentos bien seleccionados de la misma.

### Espectroscopía de RMN de $^{13}\text{C}$

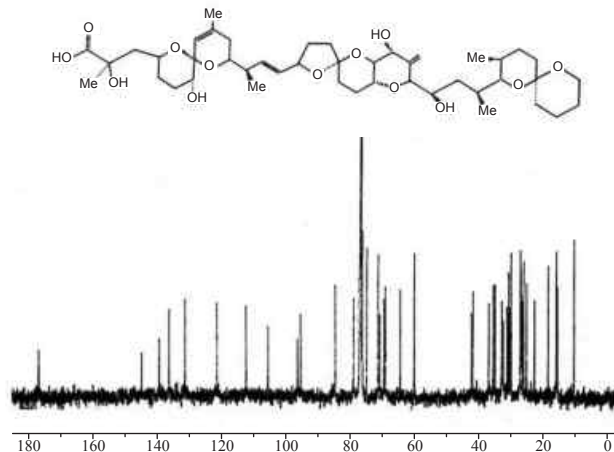
Gracias a la comercialización de los espectrómetros FT y a la introducción del desacoplamiento de protones por banda ancha, debidos ambos en gran parte a Richard Ernst (Premio Nobel de Química 1991), fue posible la universalización de la utilización de los espectros de  $^{13}\text{C}$ , generalmente desacoplados de protón, y en los que cada carbono de la molécula aparece como un singlete. En la Figura 2 se muestra el espectro de  $^{13}\text{C}$  del ácido okadaico.<sup>6</sup> El efecto NOE contribuía a incrementar la sensibilidad de estos espectros. Por otra parte, dicho efecto se comenzaba ya a utilizar con fines estructurales en experimentos individuales  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ .

### Espectroscopía de RMN bi-dimensional

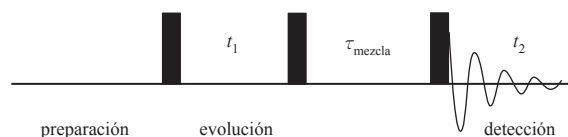
Aunque los primeros trabajos sobre espectroscopía de RMN bidimensional (2D) aparecieron en los años 70,<sup>7,8</sup> fue en la década de los 80 cuando se implementó en espectrómetros comerciales. La RMN-2D constituyó una nueva revolución en el campo, puesto que abrió la vía para el estudio de la estructura y dinámica de biomacromoléculas. En la actualidad, este término abarca un gran número de experimentos distintos, pero el principio básico es el mismo para todos. El espectro monodimensional se expande en dos dimensiones de frecuencia ortogonales, con lo que se consigue aliviar en parte el solapamiento de señales.

Un experimento típico de RMN-2D consta de varias etapas, separadas convenientemente por pulsos de *rf* (Figura 3): preparación, evolución después de haber excitado los núcleos, durante un tiempo variable  $t_1$ , mezcla en un intervalo  $\tau$ , y detección en un tiempo  $t_2$ . La dimensión adicional se origina en el intervalo de tiempo  $t_1$ , durante el cual el núcleo está sujeto a determinadas condiciones. La amplitud de la señal en  $t_2$  es una función de lo que sucedió a los núcleos durante el período de evolución,  $t_1$ . El experimento se repite para un determinado número de valores de  $t_1$  con lo que se obtiene un conjunto de espectros en el que las amplitudes de las resonancias vienen moduladas con las frecuencias que existían

en el período de evolución. Una transformación Fourier con respecto a  $t_1$  define las frecuencias de modulación y da como resultado el espectro 2D.



**Figura 2.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  en abundancia natural desacoplado del  $^1\text{H}$  del ácido okadaico,<sup>6</sup> una importante toxina, responsable de una intoxicación por mejillones, producida en las Rías Bajas. El producto fue aislado en el Instituto de Productos Naturales de La Laguna y sus espectros de RMN caracterizados en nuestro laboratorio. Cada uno de los carbonos de la molécula da lugar a una señal de resonancia.

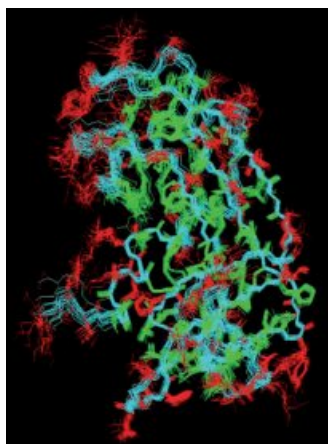


**Figura 3.** Esquema general de una secuencia de pulsos correspondiente a un experimento de RMN-2D. La dimensión  $t_2$  es la usual en los experimentos mono-dimensionales. El experimento se repite un determinado número de veces con distintos incrementos de  $t_1$  proporcionando una señal bidimensional  $s(t_1, t_2)$ .

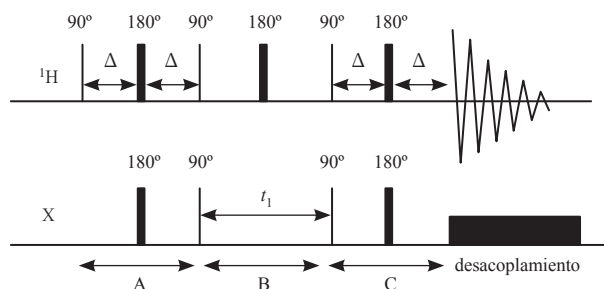
Los principales, así como los más usados, experimentos 2D homonucleares ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) son: COSY (correlation spectroscopy),<sup>9</sup> TOCSY (total spectroscopy)<sup>10</sup> y NOESY.<sup>11</sup> En el primero de ellos, se obtienen correlaciones cruzadas (picos fuera de la diagonal) entre señales correspondientes a protones acoplados escalarmente. En el segundo, mediante una combinación adecuada de pulsos de *rf*, se consigue crear una situación de fuerte acoplamiento ( $\Delta\delta_{ij} \leq J_{ij}$ ) entre protones acoplados entre sí, lo que da lugar a la observación de señales entre sistemas completos de spines, de gran utilidad en la asignación de segmentos moleculares que se extienden a lo largo de tres o más átomos de carbono. Por último, en el espectro NOESY se observan correlaciones cruzadas entre protones cercanos en el espacio cuya intensidad proporciona información acerca de la distancia que los separa. Los tres experimentos son esenciales para la asignación<sup>12</sup> de los protones de una molécula y, a partir de las intensidades de las señales NOESY, se imponen las restricciones de distancia en el cálculo de sus estructuras.

La primera estructura de una proteína en disolución obtenida por RMN (el inhibidor IIA de la proteinasa del plasma seminal bovino, 57 aa)<sup>13</sup> se determinó en el laboratorio de Kurt Wüthrich (Premio Nobel de Química 2002) en 1985.

En esa misma década, en nuestro laboratorio se asignaron los protones de la enzima ribonucleasa (124 aa) a 360 MHz y se determinó poco más tarde su estructura con la ayuda de espectros obtenidos a 600 MHz<sup>14,15</sup> (Figura 4).



**Figura 4.** Estructura de la enzima ribonucleasa en disolución acuosa obtenida por RMN-2D. La estructura se presenta como la superposición de 20 estructuras que satisfacen las restricciones de distancia derivadas del espectro NOESY-2D. En azul celeste, se muestra el esqueleto de la proteína; en verde, las cadenas laterales del interior de la misma y en rojo, las cadenas laterales de la superficie.



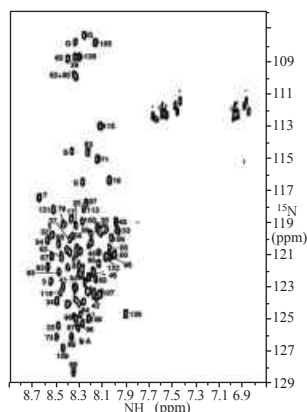
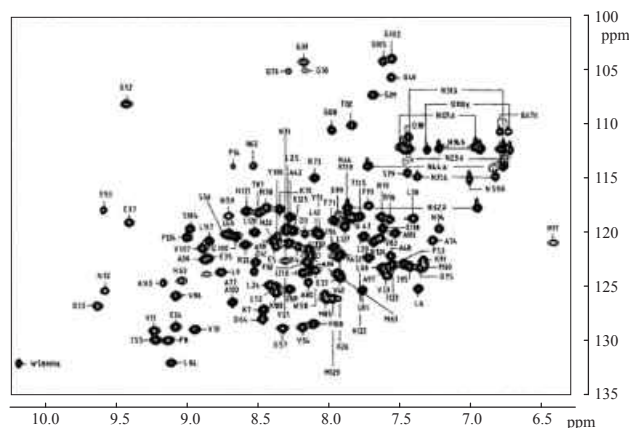
**Figura 5.** Secuencia de pulsos para el experimento HSQC<sup>17</sup> de correlación de <sup>1</sup>H con un heteronúcleo.

La utilización de la espectroscopía RMN-2D se universalizó, debido en gran parte a la explosión en el desarrollo de los ordenadores, necesarios para el cálculo de la transformación Fourier de la *fid* y obtener así el espectro convencional en el dominio de las frecuencias.

En el aspecto teórico, el modelo vectorial, muy ilustrativo hasta entonces para describir la evolución de la magnetización nuclear en experimentos sencillos, resultaba insuficiente para explicar los experimentos de pulsos, cada vez más complicados. La introducción del formalismo de matrices densidad en su aproximación de operadores producto<sup>16</sup> resultó ser de una enorme utilidad en la explicación de estos experimentos, a la vez que proporcionaba un marco teórico para el desarrollo de un sinnúmero de experimentos con aplicaciones específicas.

Del mismo modo que se obtiene un espectro de correlación COSY-2D homonuclear, es posible plantear la obten-

ción de espectros de correlación del <sup>1</sup>H con algún heteronúcleo, por ejemplo <sup>13</sup>C o <sup>15</sup>N. El experimento más corrientemente utilizado es el denominado HSQC (heteronuclear single-quantum correlation),<sup>17</sup> cuya secuencia de pulsos se muestra en la Figura 5. Los períodos A y C son los denominados “ecos de spin”, en los que se aplican pulsos de 180° a ambos spines. Los desfases debidos a los desplazamientos químicos se re-enfocan al final del período, pero el acoplamiento evoluciona durante el tiempo total, que se escoge como  $2\Delta=1/(2J_{HX})$ , siendo  $J_{HX}$  la constante de acoplamiento a través del enlace que une al <sup>1</sup>H con el heteronúcleo. Con ello, se crea la condición necesaria (conversión de magnetización en-fase en anti-fase) para la transferencia de magnetización (más correctamente transferencia de coherencia) al núcleo X, lo que se lleva a cabo mediante pulsos de 90° simultáneos a ambos spines. El conjunto de pulsos en <sup>1</sup>H y X se conoce como experimento INEPT (Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer).<sup>18</sup> En el período B se crea la dimensión correspondiente al heteronúcleo variando el tiempo  $t_1$  a la vez que, mediante un pulso de 180° que afecta sólo al <sup>1</sup>H, se re-enfocan, al final del período, tanto el desplazamiento químico del mismo como el acoplamiento mutuo. La magnetización se devuelve al <sup>1</sup>H (período C). Un nuevo experimento de eco de spin realiza la operación contraria a la llevada a cabo al principio del



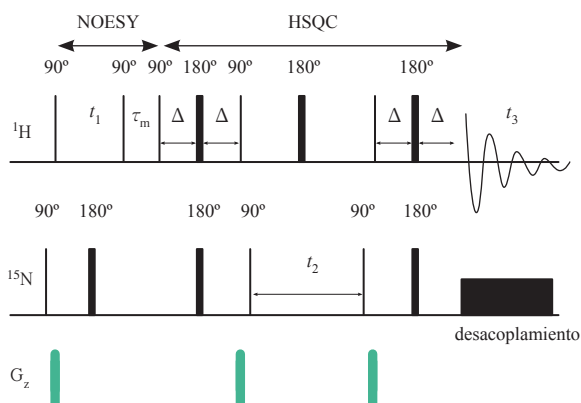
**Figura 6.** Espectro HSQC <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N de la proteína Che Y (129 aa)<sup>19</sup> etiquetada uniformemente con <sup>15</sup>N. Arriba: la forma nativa. Abajo: la forma desnaturalizada en 6M urea. Las escalas de los espectros, horizontal (<sup>1</sup>H), y vertical (<sup>15</sup>N) son aproximadamente equivalentes. Obsérvese la gran diferencia en la dispersión de señales en ambas dimensiones.

experimento (conversión de magnetización anti-fase en magnetización en-fase), que se detecta, mientras se desacopla el heteronúcleo. Un ejemplo de espectro HSQC en donde se correlacionan los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{15}\text{N}$  se ilustra en la Figura 6. El espectro<sup>19</sup> corresponde a la forma nativa de la proteína Che Y, un regulador de respuesta quimiotáctica en bacterias. Nuestro interés estaba más bien centrado en su comportamiento respecto al plegamiento. En la Figura 6 (abajo) se muestra el espectro correspondiente a la forma desnaturada de la proteína en 6M urea. Hay que hacer notar la gran diferencia en la dispersión de señales entre los espectros de las formas nativa y desplegada. A pesar del gran solapamiento del espectro de ésta última, fue posible la asignación de cada señal a residuos concretos de la proteína. Con ello pudo seguirse la evolución de las señales NH individuales en función de la concentración de urea. Un análisis termodinámico de esos datos proporcionó una descripción detallada, a nivel de residuo, del proceso de plegamiento-desplegamiento, incluyendo la caracterización de un intermediario.

El espectro HSQC es de esencial importancia en el proceso de diseño y descubrimiento de nuevos fármacos por la técnica de RMN,<sup>20</sup> debido fundamentalmente a la extrema sensibilidad de los desplazamientos químicos respecto a interacciones receptor-ligando, que pueden detectarse aún en el caso de que éstas sean de muy pequeña afinidad, lo que la hace singularmente útil con propósitos de detectarlas.

### Espectroscopía de RMN tri- y multi-dimensional

En el análisis estructural de proteínas por RMN, pronto se vio que, con sólo experimentos homonucleares, no podría sobrepasarse un determinado tamaño (120-140 aa), debido al gran solapamiento de señales que se producía, incluso en los experimentos RMN-2D. La extensión a espectroscopía de RMN tridimensional (3D)<sup>21</sup> fue inmediata. Los experimentos más usuales eran los correspondientes a un espectro homonuclear 2D (por ejemplo, NOESY-2D), al que se añade una tercera dimensión, el desplazamiento químico de un heteronúcleo, normalmente  $^{15}\text{N}$ , lo que requiere el etiquetado uniforme de la proteína, que se lleva a cabo mediante la utilización de

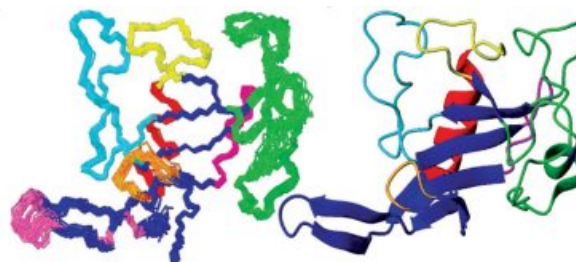


**Figura 7.** Secuencia de pulsos del experimento 3D  $^{15}\text{N}$ -NOESY. Consta de dos partes: la secuencia NOESY homonuclear con desacoplamiento del  $^{15}\text{N}$ , y del módulo HSQC, anteriormente descrito. En la fila de abajo se incluyen tres gradientes de campo pulsados, cuya finalidad es la de eliminar coherencias no deseadas.

métodos recombinantes en medios mínimos incluyendo sales de  $(^{15}\text{NH}_4)^+$  como única fuente de nitrógeno. En la Figura 7 se ilustra un esquema de la secuencia de pulsos correspondiente al experimento 3D- $^{15}\text{N}$ -NOESY, que proporciona una serie de planos correspondientes a los efectos NOE  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  observados para los protones amídicos unidos a nitrógenos con un determinado desplazamiento químico.

En la Figura 8, se ilustra la estructura de la ribonucleasa  $\alpha$ -sarcina,<sup>22</sup> determinada en nuestro laboratorio a partir del análisis de los experimentos 2D convencionales, junto con experimentos 3D- $^{15}\text{N}$ -TOCSY y 3D- $^{15}\text{N}$ -NOESY, obtenidos a partir de una muestra uniformemente etiquetada con  $^{15}\text{N}$ , obtenida en el Departamento de Bioquímica de la Universidad Complutense de Madrid. La  $\alpha$ -sarcina es una ribonucleasa de 150 aa muy específica que escinde un enlace bien determinado del ácido nucleico ribosómico, inactivando el ribosoma y conduciendo a la muerte celular.

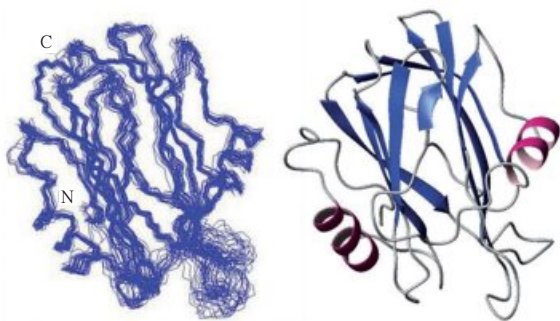
El objetivo de extender la metodología de RMN a la determinación de la estructura y dinámica de proteínas de mayor tamaño se enfrentaba al grave problema del solapamiento de señales, debido al gran aumento en el número de ellas a medida que crece el tamaño de la biomacromolécula. A la solución del problema contribuyó la utilización de muestras doblemente marcadas con  $^{15}\text{N}$  y  $^{13}\text{C}$ , cuya utilización ya es rutinaria en todos los laboratorios, una vez que los precios de la  $u\text{-}^{13}\text{C}$ -glucosa empleada como nutriente, se han hecho accesibles. Con estas muestras es posible llevar a cabo experimentos 3D que conducen la asignación de señales a núcleos concretos de la proteína utilizando únicamente transferencias de coherencias escalares (a través de enlaces). Dado el valor similar de la constante  $^1J_{^{15}\text{N}^{13}\text{C}\alpha}$  (7-11 Hz) y  $^2J_{^{15}\text{N}^{13}\text{C}\alpha(i-1)}$  (4-9 Hz) es posible transferir la magnetización del  $^1\text{H}$  amídico al  $^{15}\text{N}$  y de éste, simultáneamente, a los  $\text{C}\alpha$  del propio residuo y del residuo precedente en la secuencia, con lo que se establece una conexión entre residuos esencial para su asignación. Este experimento 3D se conoce como HNCA,<sup>23</sup> siglas que incluyen a los tres núcleos ( $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  y  $^{13}\text{C}$ ) implicados en la transferencia de coherencia. Del mismo modo, es posible establecer otras relaciones entre coherencias, tanto como para resolver ambigüedades, caso del HN(CO)CA, en el que se obtiene una correlación del  $^1\text{H}$  y del  $^{15}\text{N}$  con sólo el  $\text{C}\alpha$  del residuo anterior, como para asignar nuevos núcleos, como en el caso del HNC(O), o los HNCACB o similares.<sup>24</sup> Con ello quedan asignados las resonancias correspondientes a los núcleos del esqueleto de la proteína, incluyendo los de la posición  $\beta$ .



**Figura 8.** Izquierda: superposición de 20 estructuras obtenidas para la proteína  $\alpha$ -sarcina (150 aa). Derecha: representación tipo cinta. La estructura se determinó utilizando una muestra uniformemente etiquetada con  $^{15}\text{N}$ .

Los núcleos de las cadenas laterales se asignan mediante los muy eficientes experimentos HCCH-TOCSY y HCC-TOCSY.<sup>24</sup> El análisis de estos experimentos es susceptible de ser automatizado, con lo que puede llegarse a una asignación de todas las resonancias implicadas, con una limitada intervención humana.<sup>25,26</sup> Una vez concluida la asignación, resulta ya más sencillo el análisis y caracterización de los espectros NOESY, de donde se derivan las restricciones de distancia, en las que se apoya la determinación de la estructura 3D de la proteína. Conocida la asignación de resonancias, la asignación de NOEs es también susceptible de ser automatizada.<sup>27</sup> Con proteínas doblemente etiquetadas es posible la determinación de estructuras de proteínas de hasta 30-40 kDa.

En la Figura 9 se ilustra la estructura de la proteína estiocolisina I (176 aa),<sup>28</sup> una toxina formadora de poros, producida por una anémona de mar, determinada en nuestro laboratorio a partir de una muestra doblemente etiquetada con <sup>15</sup>N y <sup>13</sup>C, obtenida en el Departamento de Bioquímica de la Universidad Complutense de Madrid. El objetivo era determinar su interacción con membranas y su papel en la formación del poro.



**Figura 9.** Izquierda: superposición de las 20 mejores estructuras de estiocolisina I (176 aa),<sup>28</sup> una toxina formadora de poros en membrana. Derecha: representación tipo cinta. Se utilizó una muestra doblemente etiquetada con <sup>15</sup>N y <sup>13</sup>C.

### Gradientes de campo pulsados

También en el aspecto instrumental conviene mencionar la introducción de los gradientes de campo pulsados,<sup>29</sup> una de las técnicas tomadas en préstamo de la Resonancia Magnética de Imagen (MRI, en sus siglas inglesas), que por aquella época había llegado a su mayoría de edad, y competía en términos de igualdad con la Tomografía Axial Computerizada (TAC) e, incluso, presentaba algunas ventajas sobre ella.

Los experimentos multipulso, tales como el HSQC, descrito más arriba, suelen afectar a los spines siguiendo diferentes caminos y, como resultado, el espectro final puede contener más resonancias que las esperadas en el experimento diseñado. Hay dos modos principales de seleccionar las señales que realmente interesan: el primero es el conocido como ciclado de fases en el que el experimento se repite un número de veces en las que las fases de los pulsos se varían de una forma bien establecida. Las correspondiente *fids* se combinan de forma que las señales deseadas se sumen y las no deseadas se cancelen. El segundo, emplea los pulsos de gradiente de campo, con los que deliberadamente se introduce una inhomogeneidad en el campo magnético. Si el pulso de gradiente se establece a lo largo del eje *z* (caso más común) las magnetizaciones (o coherencias) en el plano *xy* se

desfasan y, aparentemente, se pierden. Sin embargo, si se aplica a continuación un nuevo pulso de gradiente con la fase opuesta, hace que las coherencias se re-enfoquen. Mediante una elección cuidadosa de los pulsos de gradiente, dentro de una secuencia multipulso, es posible asegurar que sólo las coherencias deseadas se re-enfoquen. Una vez superadas las dificultades técnicas en su incorporación a los espectrómetros comerciales, hoy se utilizan rutinariamente para la selección de coherencias (véase Figura 7). Una de sus obvias ventajas es su utilización en la eliminación de la señal de H<sub>2</sub>O, disolvente empleado normalmente en las muestras de biomacromoléculas.

### Aplicaciones en Química Estructural

En cuanto a lo que se refiere a la estructura de productos de interés en Química, con carácter general, y más en particular en la química de productos naturales, con masas moleculares del orden de los 1000 Da o inferiores, podía ya perfeccionarse un protocolo para la determinación de su estructura que comprende las siguientes etapas: a) determinación de la masa molecular por espectrometría de masas o cualquier otro medio; b) espectros mono-dimensionales de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C; c) espectro COSY-2D para establecer conexiones <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H geminales y vecinales; d) espectro TOCSY-2D para determinar fragmentos moleculares conteniendo protones acoplados entre sí; e) espectro de correlación HSQC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C, en donde se correlaciona cada carbono con los hidrógenos unidos a él; y f) espectro de correlación HMBC (heteronuclear multiple bond correlation) <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C<sup>30</sup> para completar las conexiones estructurales. Las conformaciones moleculares podrían determinarse mediante la utilización de los acoplamientos  $J_{HH}$ , y, en su caso, las  $J_{HC}$  derivables de espectros *ad hoc* 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C. Ello se complementaría con distancias evaluadas a partir de espectros ROESY (rotating-frame NOE spectroscopy),<sup>31</sup> una técnica específica para amplificar el efecto NOE para tiempos de correlación correspondientes a masas moleculares de ese orden.

### Desarrollos más recientes

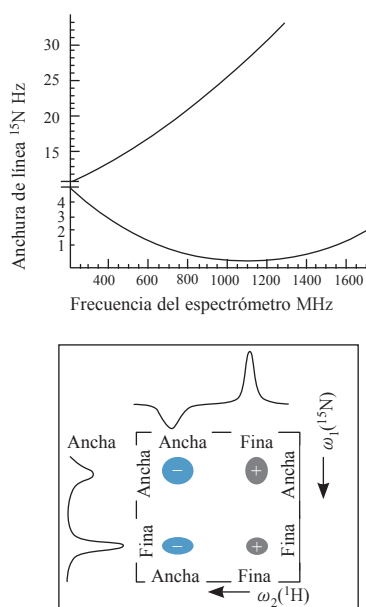
En la década de los 90 se continuó la carrera hacia campos más altos, llegándose progresivamente a los 700, 750, 800 y, por último, 900 MHz. Al final de la década se presentaron también los primeros prototipos de criosondas, en las que las bobinas de transmisión y recepción y toda la electrónica de la sonda van enfriadas con helio a 25K, con lo que se consigue incrementar la relación señal/ruido unas 3-4 veces, lo que en ahorro de tiempo significa, como mínimo, un orden de magnitud.

El segundo problema con proteínas de mayor tamaño es el ensanchamiento de líneas debido al aumento del tiempo de correlación  $\tau_c$  de la molécula. Una solución consiste en el etiquetado de la proteína con deuterio, cuya relación giromagnética ( $\gamma_D$ ) es 6-7 veces menor que la del <sup>1</sup>H, con lo que la relajación dipolar, origen de la anchura de las líneas, se reduce considerablemente, ya que depende de los cuadrados de las  $\gamma$ s de los núcleos involucrados. Con ello, sin embargo, se pierde la más importante fuente de información en la determinación de estructuras, los efectos NOE <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H. Lo que suele hacerse es conservar como <sup>1</sup>H los protones amídicos, fáciles de introducir por intercambio con los del disolvente y los de determinados grupos metilo de alaninas, valinas, leucinas e isoleucinas mediante la adición al medio recombinante de nutrientes marcados selectivamente.

## El experimento TROSY

Dentro de esa línea, a mediados de los 90, el grupo de Wüthrich, desarrolló el experimento denominado TROSY (Transverse Relaxation Optimization Spectroscopy),<sup>32</sup> que permite obtener señales relativamente finas de proteínas de gran tamaño.

A campos magnéticos altos, la anisotropía del desplazamiento químico (el campo magnético inducido es una magnitud tensorial) puede contribuir significativamente a la relajación transversal, en competición con el mecanismo del acoplamiento dipolar. El experimento TROSY se basa en la interferencia destructiva de los dos mecanismos. En la Figura 10 (izquierda) puede verse la variación, con respecto a la intensidad del campo magnético externo, de la anchura de línea de  $^{15}\text{N}$ , correspondiente a las dos componentes del doblete de  $^{15}\text{N}$  acoplado al  $^1\text{H}$  al que está unido. En una de ellas, la relajación transversal (y correspondientemente la anchura de la línea) se incrementa, mientras que en la otra componente se reduce, hasta llegar a un mínimo en las proximidades de un campo correspondiente a la frecuencia de 1000 MHz para el  $^1\text{H}$ .



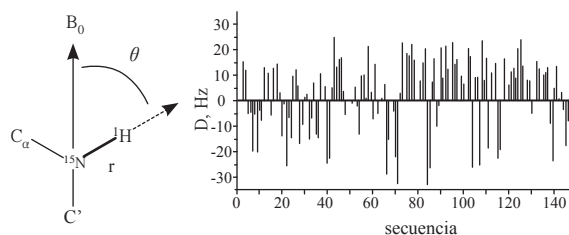
**Figura 10.** Izquierda: variación de las anchuras de las dos componentes del doblete de  $^{15}\text{N}$  acoplado al  $^1\text{H}$  al que está unido en un enlace amídico, en función de la intensidad del campo magnético. Derecha: las cuatro componentes del espectro 2D  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  acoplado, mostrando las diferentes anchuras. En el espectro TROSY, se selecciona la señal más fina de entre las cuatro.

El efecto del mecanismo de relajación de la anisotropía del desplazamiento químico (CSA en sus siglas inglesas) es mayor para los enlaces N-H amídico, C=O peptídico y C-H aromáticos, en los que la anisotropía es más acusada. En un experimento HSQC sin desacoplar se observan cuatro líneas que muestran distintos tiempos de relajación transversal y, por tanto, diversas anchuras. De ellas, se elige la línea más fina (Figura 10), lo que permite observar espectros con una resolución significativa en proteínas de 100 kDa y mayores.

El experimento TROSY suele acompañarse del llamado CRINEPT<sup>33</sup> (cross-correlated relaxation INEPT), utilizado en la transferencia de polarización inter-nuclear en lugar del más convencional INEPT, y que presenta sobre éste la ventaja de una ganancia en sensibilidad para moléculas grandes (200 kDa).

## Acoplamiento Dipolares Residuales (RDCs)

Otro de los recientes desarrollos dignos de ser mencionados es la observación y medida de los acoplamiento dipolares residuales (RDCs).<sup>34</sup> En medios anisotrópicos, como, por ejemplo, un disolvente con las características de un cristal líquido, las moléculas en disolución pueden orientarse parcialmente a la vez que gozan de una cierta difusión rotacional, con lo que se hace posible la medida de los acoplamiento dipolares residuales, a partir de los cuales pueden determinarse las orientaciones de los vectores internucleares respecto al eje de orientación molecular (Figura 11, izquierda). Estas orientaciones constituyen una nueva relación entre un parámetro magnético y un parámetro geométrico, que resulta ser de gran utilidad en el análisis estructural. Se utilizan normalmente para refinar estructuras calculadas con base en los NOEs (Figura 11, derecha). Las RDCs presentan la ventaja de ser totalmente independiente de la principal fuente de información estructural (los efectos NOE) y de superar el mayor inconveniente de éstos: su corto alcance. Así los RDCs son especialmente útiles, por ejemplo, en la determinación de la orientación relativa de dominios en proteínas multidominio.



**Figura 11.** Izquierda: Mediante la medida de los acoplamiento dipolares residuales (RDCs) es posible determinar las orientaciones del vector que une los enlaces  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  con respecto al campo magnético. Derecha: RDCs de cada uno de los enlaces  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  de los residuos de la proteína  $\alpha$ -sarcina (Figura 8), parcialmente orientada en el medio alquil-poli-etilén-glicol  $\text{C}_{12}\text{E}_6$ . En este caso, los RDCs se utilizaron para refinar la estructura determinada a partir de restricciones de enlace derivadas de NOEs.<sup>35</sup>

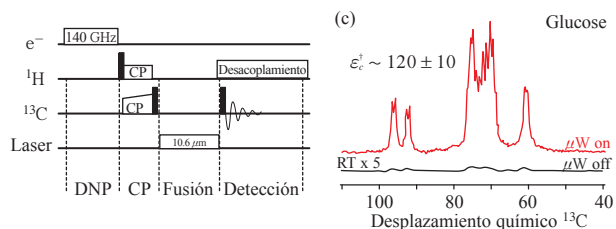
## El nuevo siglo: desarrollos y perspectivas futuras

La baja sensibilidad inherente a la espectroscopía de RMN sigue constituyendo su principal problema. La carrera en el desarrollo de campos más altos prosigue con dificultad. Así, se ha tardado casi una década en conseguir la instalación del primer espectrómetro comercial de 1GHz (Lyon, Francia). La búsqueda de otros caminos para incrementar la sensibilidad, o para reducir el tiempo de medida, no cesa. Ello constituye una necesidad esencial en resonancia magnética de imagen (MRI) con fines clínicos, de la que se toman prestadas técnicas y programas.

### Polarización Dinámica Nuclear (DNP)

Un importante desarrollo es la denominada polarización dinámica nuclear (DNP), con la que es posible incrementar la sensibilidad de la señal de RMN en sólidos y líquidos. En un experimento de DNP, la polarización de un electrón desapareado, endógeno o exógeno, se transfiere al núcleo de interés  $I$  mediante irradiación de la muestra con microondas. Con ello puede lograrse un gran incremento en la intensidad de la señal del núcleo, cuyo máximo teórico es el cociente de las relaciones giromagnéticas del electrón y el núcleo  $\gamma_e/\gamma_n$ , que resulta ser de 660 para el protón.

En uno de los instrumentos comerciales existentes,<sup>36</sup> la muestra, situada en el polarizador, se disuelve en H<sub>2</sub>O-DMSO junto con una sustancia con un radical libre, se lleva a una temperatura de 1,4 K y se irradia con microondas durante un tiempo dado (15 minutos a 4 horas). Posteriormente, la muestra se disuelve de nuevo en caliente, se transfiere de forma automática al espectrómetro y se toma el espectro. Todo ello ha de hacerse rápidamente para evitar que la polarización transferida al núcleo se pierda por relajación. La técnica se aplica principalmente a núcleos de una pequeña relación giromagnética como el <sup>13</sup>C o el <sup>15</sup>N, para los que los máximos teóricos de incremento de sensibilidad son mayores. El grupo de Griffing<sup>37</sup> ha propuesto recientemente un dispositivo instrumental, conocido como TJ-DNP (salto de temperatura-DNP) que permite la acumulación de espectros (véase Figura 12), en el que sucesivamente la muestra se enfría (90 K), se polariza, se funde mediante la acción de un láser de IR para obtener finalmente el espectro. La técnica de DNP es de indudable utilidad para reducir cantidades de sustancia, tiempos de adquisición de espectros, lo que la hace especialmente útil para ser aplicada en Cinética Química.



**Figura 12.** Experimento in situ TJ-DNP (polarización dinámica nuclear con salto de temperatura).<sup>37</sup> Izquierda, secuencia de pulsos y ciclo del experimento. Derecha: espectro <sup>13</sup>C-TJ-DNP de u-<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>2</sup>H<sub>7</sub>-glucose en H<sub>2</sub>O. La muestra contenía 3-5 mM de totalopol un biradical utilizado como agente polarizador. El espectro en rojo corresponde a 1 barrido y el negro, sin polarizar, a 256. El incremento en sensibilidad obtenido es de 120.

### Micro-crio-sondas

Se han hecho también progresos en el diseño y optimización de las sondas en los espectrómetros dirigidas a mejorar la sensibilidad, en especial, por reducción en el volumen de los tubos muestra y del tamaño de las bobinas de rf y su enfriamiento a temperaturas cercanas al He líquido (micro-crio-sondas). En el análisis estructural de productos naturales se ha podido llegar a obtener espectros mono- y bi-dimensionales, en tiempos razonables, utilizando tubos de 1,7 mm de diámetro (35  $\mu$ L de volumen e incluso de 1,0 mm (7  $\mu$ L) conteniendo 100-10  $\mu$ g de producto, en el rango de los nanomoles.<sup>38</sup> También ha sido posible obtener el espectro HSQC

<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N de 72  $\mu$ g (0.7nm) de una pequeña proteína de 63 aa, utilizando una micro-criosonda conteniendo un tubo de 1mm de diámetro en 1,3 horas a 600 MHz.<sup>39</sup>

### Muestreo parcial

Tan importante como incrementar la sensibilidad es reducir el tiempo de adquisición de espectros, sobre todo en el caso de los experimentos multidimensionales, necesarios en la caracterización estructural y dinámica de bio-macromoléculas. Si bien en una de las dimensiones, la evolución de los spines nucleares se detecta mediante el procedimiento clásico de medir la corriente inducida en la bobina receptora, en las demás dimensiones es necesario el registro de un número de espectros (que determina la resolución deseada) con un incremento dado en un tiempo de demora entre pulsos, que determina la anchura de barrido. El tiempo experimental requerido para obtener un espectro  $n$ D se incrementa aproximadamente en dos órdenes de magnitud por dimensión,<sup>40</sup> con lo que un espectro 4D puede llevar varios días, lo que resulta impracticable. La solución al problema está en tratar de reducir el muestreo de espectros en las dimensiones indirectas, sin pérdida de sensibilidad y sin pérdida de información.

El procedimiento más aplicado con carácter general es de evitar el muestreo total de  $n_1 \times n_2$ , eligiendo incrementos conjuntos de los tiempos de evolución en las dimensiones indirectas ( $t_1$  y  $t_2$ ), lo que se conoce como muestreo radial: en el primer caso, tendríamos un rectángulo lleno de puntos filas y columnas, mientras que en el segundo, tendríamos rectas de distinta pendiente, partiendo del origen ( $t_1=t_2=0$ ).

Los espectros resultantes de un muestreo radial son equivalentes a proyecciones 2D, a partir de los cuales es posible reconstruir el espectro 3D. Existen distintos procedimientos para la reconstrucción de la información total del espectro 3D.<sup>41,42,43</sup> Con estas técnicas de reducción de la dimensionalidad es posible ahorrar una enorme cantidad de tiempo experimental, que puede alcanzar varios órdenes de magnitud, en especial para  $n > 3$ .

Existen otras dos formas de reducir el tiempo de experimento: la primera es la de sustituir una de las coordenadas de muestreo por pulsos selectivos de frecuencia (espectroscopía Hadamar), que exige el conocer de antemano el espectro y suele limitarse a la detección de unas pocas resonancias. En la segunda, que examinaremos a continuación, se sustituye el muestreo en el tiempo por una coordenada (RMN ultra-rápida).

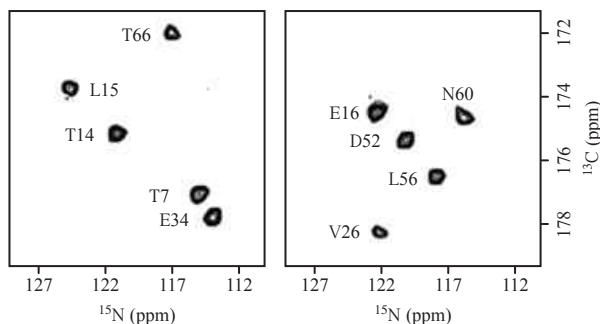
### Espectroscopía de RMN ultra-rápida

En el año 2002, el grupo de Frydman introdujo la denominada espectroscopía de RMN ultra-rápida,<sup>44</sup> por la que es posible obtener un espectro 2D, en un sólo barrido. La evolución de los spines codificada por los incrementos de tiempo en la dimensión indirecta se consigue mediante la utilización de un gradiente de campo en la dirección  $z$ , en combinación con un tren de pulsos selectivos en esa dirección. Con la discriminación espacial en la adquisición directa en  $t_2$  y posterior Transformación Fourier se obtiene el espectro 2D. Mediante esta técnica pueden obtenerse los distintos tipos de espectros 2D (COSY, TROSY y NOESY), en un tiempo de fracciones de segundo. La técnica se ha extendido también a la obtención de espectros 3D y 4D. Es especialmente útil para el seguimiento de cinéticas y detección y caracterización de intermediarios de reacción.



### Pulsado rápido

En todos los experimentos de RMN, incluidos los mono-dimensionales, es preciso esperar un cierto tiempo antes de reciclar, para permitir que los spines nucleares se relajen y vuelvan al estado de equilibrio. Estos tiempos suelen ser de varios centenares de milisegundos o de segundos. Otra forma de acortar el tiempo de experimento es la de intentar reducir ese tiempo de espera. Eso es lo que se consigue con el método desarrollado por Pervushin,<sup>45</sup> que consiste en incrementar la relajación longitudinal (LRE, longitudinal relaxation enhancement).



**Figura 13.** Planos correspondientes a dos valores de  $\delta$  del protón H-N, de un espectro 3D-HNCO de ubiquitina 1,9 mM, obtenido a 600 MHz mediante la combinación de la técnica BEST con la de la reconstrucción de 6 proyecciones, en un tiempo total de tan sólo 2 minutos.<sup>46</sup> El tiempo de reciclado fue de 50 ms.

La idea es que los spines nucleares relajan más rápido si los spines nucleares que los rodean (otros núcleos de la molécula o los del disolvente) no están excitados. Por ello, se excitan sólo un tipo de núcleos de la molécula, por ejemplo, los protones de los enlaces amídicos de una proteína. El resultado es que los tiempos de reciclado se reducen significativamente y, con ello, el tiempo de experimento total. Paralelamente se obtiene un incremento de la sensibilidad. Existen varios programas que incorporan esta idea, también conocida como la de pulsado rápido, de los cuales el más general es el denominado BEST (Band Selective Excitation Short Transients).<sup>46</sup> En la Figura 14, se muestra una aplicación de combinada del programa BEST con la técnica de reconstrucción de proyecciones.

### Detección directa de señales de heteronúcleos

Otro de los desarrollos recientes, ligado a un específico diseño de sondas *ad hoc* es la de la detección directa de heteronúcleos, fundamentalmente  $^{13}\text{C}$ . Es precisamente ese diseño especial el que logra compensar en parte la menor sensibilidad del  $^{13}\text{C}$ , debida a su menor relación giromagnética. Este hecho, sin embargo, puede constituir una cierta ventaja, pues sus interacciones dipolares serán también menores, lo mismo que sus velocidades de relajación, con el resultado de que la anchura de sus señales será menor. Al igual que para los experimentos 3D que involucran al  $^1\text{H}$ , existe un conjunto de experimentos en los que las coherencias se transfieren y se detectan exclusivamente a través de heteronúcleos<sup>47</sup> y que se utilizan en proteínas, de la misma manera que en el caso del  $^1\text{H}$ , con propósitos de identificación de residuos y de asignación específica de secuencia. La detección en  $^{13}\text{C}$  presenta indudables ventajas en ciertos casos. El espectro 2D-HSQC  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}(\text{O})$ ,<sup>48</sup> por ejemplo, incluye a las prolinas y presenta una dispersión mucho mayor en la dimen-

sión horizontal ( $^{13}\text{C}$ ) que en el HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ , donde dicha dimensión corresponde al  $^1\text{H}$ , lo que resulta ser muy conveniente en el análisis de estructuras residuales en proteínas intrínsecamente desplegadas. Donde la detección directa de  $^{13}\text{C}$  resulta ser de especial utilidad es en el caso de proteínas con centros paramagnéticos. De hecho, fue el grupo de Bertini en Florencia,<sup>49</sup> que trabaja con esos sistemas, quien se mostró muy activo en promover su desarrollo. La interacción dipolar electrón-núcleo es un mecanismo adicional de relajación en esos casos, y el más importante. La velocidad de relajación depende de la distancia del núcleo al centro paramagnético y del cuadrado de la relación giromagnética del núcleo observado, por lo que el  $^{13}\text{C}$  se verá mucho menos afectado que el  $^1\text{H}$ . En consecuencia, las resonancias protónicas más próximas al centro paramagnético se ensanchan y desaparecen, mientras que las señales de  $^{13}\text{C}$  en esas zonas pueden seguir detectándose.

### Desplazamientos químicos y estructura molecular

En años recientes se han hecho grandes progresos en la utilización de los desplazamientos químicos como fuente de información estructural. Es bien conocido que, en el proceso de asignación, se obtienen como datos los desplazamientos químicos de todos los átomos que dan lugar a resonancias observables, una riquísima información realmente infrutilizada. En la determinación de estructuras de proteínas, esta información se utiliza de forma parcial, como, por ejemplo, para localizar segmentos de estructura secundaria, o para imponer restricciones sobre los ángulos del esqueleto  $\phi$  y  $\psi$ , mediante el frecuentemente utilizado programa TALOS.<sup>50</sup> Más recientemente, los desplazamientos químicos se han utilizado para refinar estructuras calculadas en base a NOEs e, incluso, para proponer *de novo* una estructura 3D para una proteína a partir de la secuencia y de sólo los desplazamientos químicos.<sup>51</sup> Muchos de los procedimientos utilizados en este sentido (CS-ROSETTA,<sup>52</sup> CHESIRE,<sup>53</sup> y CS23D<sup>54</sup>) se fundamentan en la siempre creciente base de datos de desplazamientos químicos elaborada con datos de proteínas ya analizadas. Lo que se ha denominado el “Santo Grial”,<sup>51</sup> el cálculo de estructuras de proteínas, con base exclusivamente en los desplazamientos químicos, parece estar cercano mediante procedimientos heurísticos.

### Cálculos mecano-cuánticos

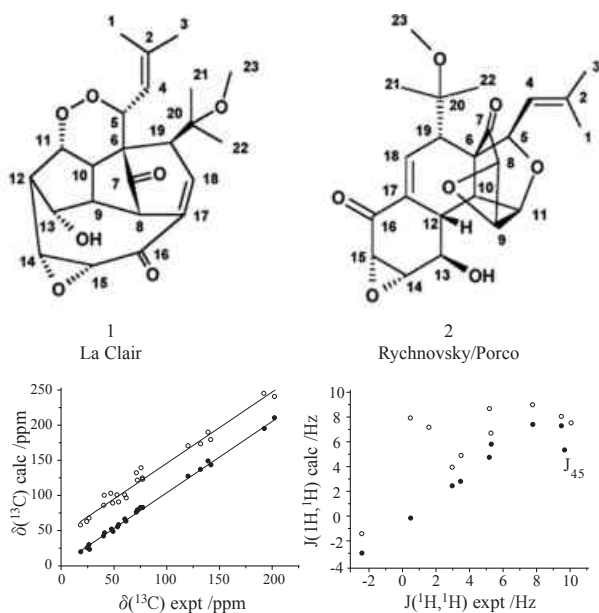
El verdadero “Santo Grial” consistiría en determinar la estructura a partir de primeros principios, es decir, mediante cálculos de Mecánica Cuántica, lo que involucraría dos pasos: uno, poder calcular con exactitud los desplazamientos químicos a partir de una estructura y dos, realizar el proceso inverso, es decir, determinar la estructura a partir de los desplazamientos químicos.

En el cálculo de desplazamientos químicos por métodos de mecánica cuántica se están consiguiendo importantes progresos. El método más utilizado es el denominado GIAO (gauge-including atomic orbitals).<sup>55</sup> En los cálculos de apantallamientos, los resultados dependen de la elección del origen o “gauge” del potencial vector que describe el campo magnético total en la posición de cada electrón. En el método GIAO se introduce una base de orbitales atómicos dependientes del “gauge”, con la que se obvia esa dificultad. El método GIAO es rápido, preciso y relativamente insensible a la elección del conjunto de orbitales base y puede incluir los efectos de la

correlación electrónica, imprescindibles para el cálculo de apantallamientos y constantes de acoplamiento. La forma más eficiente de incorporar los efectos de correlación electrónica es mediante la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT),<sup>56</sup> por lo que los métodos DFT-GIAO son los más utilizados corrientemente. Los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  pueden hoy calcularse, mediante estos métodos, con errores del orden de 0,2 ppm y 1 ppm, respectivamente. Para moléculas pequeñas o péptidos de pocos residuos, los tiempos de cálculo son muy razonables. En el ejemplo de la Figura 14 se pone de manifiesto la utilidad de estos cálculos con efectos estructurales. Veremos cómo con ellos se solucionó de forma tajante el polémico caso del hexaciclínol, un producto natural extraído del hongo *Panus rudis*.

Sobre la base de los espectros de RMN, el grupo de La Clair asignó la estructura 1 al producto natural y realizó su síntesis total.<sup>57</sup> La estructura fue contestada por el grupo de Rychnovsky<sup>58</sup> sobre la base de unos cálculos preliminares de desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$ , proponiendo la estructura 2. Porco *et al.*<sup>59</sup> realizaron la síntesis total sobre la base de la estructura 2, que confirmaron mediante Rayos X.

La Clair sugirió entonces que las dos estructuras podrían dar lugar a un mismo espectro de RMN. La disyuntiva de si dos moléculas, tan complicadas como esas, pueden tener un mismo espectro de RMN fue aclarada por Saiellie y Bugno,<sup>60</sup> que calcularon con mayor precisión los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de ambas estructuras, así como las constantes de acoplamiento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ . Las dos estructuras dan lugar a espectros distintos, y los resultados se inclinan sin lugar a dudas hacia la estructura 2: así, los errores medios en los  $\delta$ 's de  $^1\text{H}$  son de 0,2 ppm frente a 0,4, y los de  $^{13}\text{C}$  de 4,1 ppm frente a 7,1. Las



**Figura 14.** Estructuras propuestas por La Clair y por Rychnovsky/Porco para el hexaciclínol. Abajo, izquierda,  $\delta$ 's ( $^{13}\text{C}$ ) calculadas y observadas para 1 (sin relleno) y 2 (con relleno). La escala vertical está desplazada para 1, por claridad. RMSDs: para (1) 4,1 ppm; para (2) 7,1 ppm. Abajo, derecha,  $J_{\text{HH}}$  calculadas y observadas. La señalada con  $J_{45}$  puede venir afectada por un equilibrio conformacional.

constantes de acoplamiento corroboran definitivamente a la estructura 2 como la verdadera (véase Figura 14).

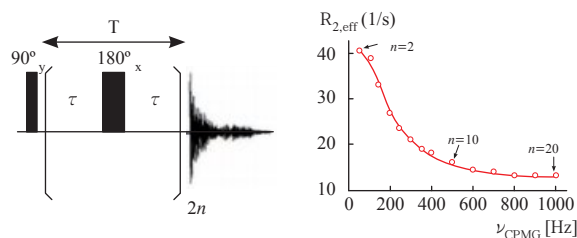
Claramente, en el campo de estructura de proteínas estamos lejos de poder alcanzar el objetivo, por el gran número de átomos a tratar y por la naturaleza fundamentalmente terciaria de las interacciones que determinan el plegamiento. Es de esperar que con el desarrollo de ordenadores más rápidos y capaces, ello sea posible en un futuro no muy lejano.

### Procesos dinámicos

La información sobre procesos dinámicos ha ido siempre unida a la información estructural en espectroscopía de RMN. La sensibilidad de la misma a movimientos moleculares de un amplio abanico de tiempos, que van desde el los picosegundos a horas o días, es bien conocida.<sup>61</sup> Todos los parámetros magnéticos proporcionan datos que pueden interpretarse en términos de procesos dinámicos, promediándose cuando éstos son rápidos y dando lugar a valores individuales de las estructuras que se intercambian cuando el proceso es lento. Cuando el proceso es muy rápido, caso de los segmentos de proteínas con flexibilidad interna con tiempos de correlación menores que el de difusión rotacional, las velocidades de relajación de los núcleos de  $^{15}\text{N}$  ( $1/T_1$ ) y ( $1/T_2$ ) junto con los valores del NOE  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  dan una medida de las amplitudes y frecuencias de esas dinámicas. En el extremo opuesto, las medidas de la velocidad de intercambio de los protones  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  con los deuterones del disolvente cuando las muestras se disuelven en  $^2\text{H}_2\text{O}$  proporcionan o bien la velocidad de desplegamiento, forma nativa  $\leftrightarrow$  forma desnaturalizada, o la energía libre correspondiente al equilibrio. En casos intermedios, es posible obtener a la vez información cinética e información termodinámica.

### Dispersión de la relajación

Hay que destacar, dentro de este campo, el experimento propuesto por el grupo de Kay,<sup>62</sup> denominado dispersión de la relajación. El experimento CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gil) es conocido desde los primeros tiempos de la técnica y se utiliza fundamentalmente para la medida de la velocidad de relajación transversal ( $R_2=1/T_2$ ). Consiste en un tren de pulsos de spin-eco con una frecuencia dada (véase Figura 15). La curva de dispersión de la relajación (a la derecha de la Figura) corresponde a un sistema en intercambio rápido. Cuando existe intercambio entre dos posiciones con desplazamientos químicos distintos ( $\Omega_A$  y  $\Omega_B$ ), en el caso de que la frecuencia  $2n$  sea pequeña ( $n=2$  en la Figura), las fases en el plano  $xy$  ( $\phi_A=\Omega_A\tau$  y  $\phi_B=\Omega_B\tau$ ) se intercambian, con el resultado de que, el re-enfoque no es tan efectivo y se produce una



**Figura 15.** Izquierda: tren de pulsos CPMG. Derecha: curva de dispersión de la relajación, obtenida por un sistema en intercambio conformacional, variando la frecuencia de repetición en el tren de pulsos CPMG.

disminución de la amplitud de la señal, lo que corresponde a una contribución adicional a la relajación. A medida que se incrementa la velocidad de repetición, disminuye la probabilidad de que se produzcan intercambios en el tiempo  $\tau$ , con lo que la velocidad de relajación eficiente disminuye, hasta que, cuando la frecuencia es muy grande ( $n=20$ ),  $R_{2,eff}$  es la misma que si no existiera intercambio. Lo importante es que, a partir del análisis de las curvas de dispersión de la relajación, es posible obtener información cinética (la velocidad de intercambio), termodinámica (la población relativa de los sitios que se intercambian) y estructural (la diferencia entre los desplazamientos químicos de los mismos). El experimento resulta de gran utilidad en la detección y caracterización de estados excitados o intermediarios en el proceso de plegamiento con una población de tan sólo 0.5% en relación a la especie mayoritaria. Es aplicable a procesos dinámicos de intercambio con escalas de tiempos característicos de  $100\text{ s}^{-1}$  a  $2000\text{ s}^{-1}$  entre los que se encuentran muchos procesos de interés químico y bioquímico.

Junto a la espectroscopía de RMN de alta resolución, se han hecho grandes progresos en espectroscopía de RMN de alta resolución en estado sólido, cuyos resultados prometen ser de gran utilidad, por ejemplo, en la determinación de estructuras de proteínas de membrana. Su descripción merecería la atención y el espacio dedicado al presente trabajo.

## Agradecimientos

Quiero agradecer vivamente a todos mis colaboradores del pasado y del presente, por su excelente trabajo, el cual ha contribuido a mantener, durante más de 40 años, a pesar de carencias y dificultades, un nivel más que digno de la Espectroscopía de RMN en nuestro país.

## Bibliografía

- J. W. Emsley and J. Feeney, *Progr. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1995**, *28*, 1–9.
- M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870–2871.
- R. R. Ernst and W. A. Anderson, *Rev. Sci. Instrum.* **1966**, *37*, 93–102.
- E. Gallego, J. Herranz, J. L. Nieto, M. Rico, J. Santoro, *Int. J. Pept. Protein. Res.* **1983**, *21*, 242–53.
- M. Rico, J. L. Nieto, J. Santoro, F. J. Bermejo, J. Herranz, E. Gallego, *FEBS Lett.* **1983**, *162*, 314–319.
- M. Norte, R. González, J. J. Fernández, M. Rico, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 7437–7446.
- J. Jeener, Ampère Summer School, Basko Polje, Yugoslavia, **1971**, (no publicado).
- A. Bax, *Two Dimensional Nuclear Magnetic Resonance in Liquids*, Reidel Publishing Co., Dordrecht/ Boston/ Lancaster, **1982**.
- W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229–2246.
- R. R. Ernst and L. Braunschweiler, *J. Magn. Reson.* **1983**, *53*, 521–528.
- J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4546–4553.
- K. Wüthrich, *NMR of proteins and nucleic acids*, John Wiley and Sons, New York, USA, **1986**.
- M. P. Williamson, T. F. Havel, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1985**, *182*, 295–315.
- M. Rico, M. Bruix, J. Santoro, C. González, J. L. Neira, J. L. Nieto, J. Herranz, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *183*, 623–38.
- J. Santoro, C. González, M. Bruix, J. L. Neira, J. L. Nieto, J. Herranz, M. Rico, *J. Mol. Biol.* **1993**, *229*, 722–34.
- R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaum, *Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions*, Clarendon Press, Oxford, **1987**.
- G. Bodenhausen, D. J. Ruben, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69*, 185–189.
- G. A. Morris, R. Freeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 760–762.
- P. García, L. Serrano, M. Rico, M. Bruix, *Structure* **2002**, *10*, 1173–1185.
- M. Pellecchia, I. Bertini, D. Cowburn, C. Dalvit, E. Giralt, W. Jahnke, T. L. James, S. W. Homans, H. Kessler, C. Luchinat, B. Meyer, H. Oschkinat, J. Peng, H. Schwalbe, G. Siegal., *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2008**, *9*, 738–745.
- D. Marion, L. E. Kay, S. W. Sparks, D. A. Torchia, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1515–1517.
- J. M. Pérez-Cañadillas, R. Campos-Olivas, J. Lacadena, A. Martínez del Pozo, J. G. Gavilanes, J. Santoro, M. Rico, M. Bruix, *Biochemistry* **1998**, *37*, 15865–15876.
- L. E. Kay, M. Ikura, R. Tschudin, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1990**, *89*, 496–514.
- J. Cavanagh, W. J. Fairbrother, A. G. Palmer III, M. Rance, N. Skelton, *Protein NMR Spectroscopy. Principles and Practice*, Academic Press, **2007**.
- M. C. Baran, Y. J. Huang, H. N. Moseley, G. T. Montelione, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3451–3456.
- D. Malmodin, C. H. Papavoin, M. Billeter, *J. Biomol. NMR* **2003**, *27*, 69–79.
- P. Güntert, *Eur. Biophys. J.*, **2009**, *38*, 129–143.
- I. Castrillo, N. A. Araujo, J. Alegre-Cebollada, J. G. Gavilanes, A. Martínez del Pozo, M. Bruix, *Proteins* **2010**, *78*, 1959–1970.
- R. E. Hurd, *J. Magn. Reson.* **1990**, *87*, 422–428.
- A. Bax, M. Summers, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2093–2094.
- A. A. Bothner-by, R. L. Stephens, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 811–813.
- K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich, *Proc. Nat. Sci. USA* **1997**, *94*, 12366–12371.
- Riek R., K. Pervushin, K. Wüthrich, *Trends Biochem. Sci.* **2000**, *25*, 462–468.
- J. R. Tolman, J. M. Flanagan, M. A. Kennedy, J. H. Prestegard, *Proc. Nat. Sci. USA* **1995**, *92*, 9279–9283.
- M. F. García-Mayoral, D. Pantoja-Uceda, J. Santoro, A. Martínez del Pozo, J. G. Gavilanes, M. Rico, M. Bruix, *Eur. Biophys. J.* **2005**, *34*, 1057–1065.
- J. H. Ardenkjaer-Larsen, B. Fridlung, A. Gram, G. Hansson, L. Hansson, M. H. Lerche, R. Servin, M. Thaning, K. Golman, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 10158–10163.
- T. Maly, G. T. Debelouchina, V. S. Bajaj, K. Hu, Ch. Joo, M. L. Mak-Jurkauskas, J. R. Sirigiri, P. C. A. van der Wel, J. Herzfeld, R. J. Temkin, R. G. Griffin, *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 52211–52219.
- T. F. Molinski, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 321–329.
- J. M. Aramini, P. Rossi, C. Ankin, R. Xiao, G. T. Montelione, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 491–493.
- I. C. Felli, B. Brutscher, *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 1356–1368.
- E. Kupče, R. Freeman, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13958–13959.
- S. Kim, T. Szyperski, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1385–1393.
- D. Malmodin, M. Billeter, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13486–13487.
- L. Frydman, T. Scherf, A. Lupulescu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15858–1582.

45. K. Pervushin, B. Vögeli, A. Eletski, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12898–12902.
46. P. Schanda, H. Van Melckebeke, B. Brutscher *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9042–9043.
47. V. Csizmok, I. C. Felli, P. Tompa, L. Banci, I. Bertini, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16873–16879.
48. W. Bermell, I. Bertini, I. C. Felli, R. Peruzzini, R. Pieratelli, *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 689–695.
49. I. Bertini, B. Jiménez, M. Piccioli, *J. Magn. Reson.* **2005**, *174*, 125–132.
50. Y. Shen, F. Delaglio, G. Cornilescu, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **2009**, *44*, 213–223.
51. D. S. Wishart, *Progr. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2010**, en la imprenta. doi:10.1016/j.pnmrs.2011. 58, 62–87.
52. R. Das, D. Baker, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 363–382.
53. K. J. Kohlhoff, P. Robustelli, A. Cavalli, X. Salvatella, M. Vendruscolo, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13894–13895.
54. D. S. Wishart, D. Arndt, M. Berjanskii, P. Tang, J. Zhou, G. Lin, *Nucleic Acid Res.* **2008**, *36*, W496–502.
55. K. Wolinski, J. F. Hinton, P. Pulay, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8251–8260.
56. C. Van Müllen, en *Calculation of NMR and EPR Parameters*, (Eds. M. Kaupp, M. Bühl and V. G. Malkin), Wiley-VCH, Weinheim, **2004**, p. 85.
57. J. J. La Clair, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2769–2773.
58. S. D. Rychnovsky, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2895–2898.
59. J. A. Porco Jr., S. Su, X. Lei, S. Bardhan, S.D. Rychnovsky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5790–5792.
60. G. Saielli, A. Bugno, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1409–1412.
61. A. K. Mittermaier, L. E. Kay, *Trends Biochem. Sci.* **2009**, *34*, 601–611.
62. D. M. Korzhnev, L. E. Kay, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 442–451.

V Reunión Químico- Orgánica del Mediterráneo  
 III Reunión del Grupo Especializado de Química  
 de Productos Naturales de la RSEQ

**V REQOMED**  
**III REGPRONAT**

CÁDIZ  
 8-10 DE JUNIO, 2011

<http://www.vreqomed2011.com/>