

ARTÍCULO DIVULGATIVO: *La Resonancia Magnética Nuclear en la biología actual*

Dr. José Luis Neira
Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC)
Universidad Miguel Hernández (Elche)

1. Introducción. La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica espectroscópica extremadamente versátil que ha experimentado un avance espectacular en los últimos años. Los avances en instrumentación, sofisticadas secuencias de pulsos (un pulso es la forma en la que se consiguen producir los saltos entre los niveles cuánticos), y las nuevas técnicas de biología molecular (que permiten obtener muestras marcadas en isótopos estables en grandes cantidades) han jugado un papel importante en el desarrollo reciente de la técnica. En el estado actual, la RMN se ha convertido en una herramienta potente no solo para la determinación estructural de macromoléculas biológicas en disolución, sino también para la caracterización de la dinámica molecular en una gran variedad de escalas de tiempo y para la detección de interacciones moleculares de variadas naturalezas. Probablemente la aplicación a la determinación estructural sea la vertiente más conocida de la RMN en el área de las biomoléculas. En este campo, lo más interesante son los nuevos desarrollos que permiten determinar la estructura en disolución de proteínas de pesos moleculares que parecían inalcanzables hasta hace realmente poco tiempo

(actualmente el récord está en proteínas de un tamaño de 800 aminoácidos cuya estructura ha sido resuelta por RMN). En esta breve introducción, no describiremos los avances en la elucidación estructural de macromoléculas de la técnica sino nos centraremos en las otras aplicaciones menos conocidas, pero no por ello, menos usadas de la RMN.

Las otras aplicaciones mencionadas de la RMN, dinámica e interacciones, no son menos importantes tanto por la información a nivel atómico que aportan como por las implicaciones funcionales, mecanísticas y de diseño que puede obtenerse a partir de los resultados. Esto es relevante ya que la función biológica de una proteína depende en gran manera de las interacciones que puede establecer con otras moléculas ya sean otras proteínas, ácidos nucleicos, pequeños ligandos o lípidos. Pero además, estos procesos de reconocimiento están claramente determinados por la movilidad y dinámica de las moléculas que interaccionan. Esta movilidad interviene a dos niveles, el de la proteína como un ente global, y la de cualquiera de sus partes, segmentos, regiones,

residuos o átomos individuales. Podemos decir que actualmente para entender la función biológica de una proteína se requiere además de conocer la estructura, tener conocimiento preciso de los procesos de reconocimiento a nivel atómico y de los mecanismos dinámicos que intervienen en los mismos.

2. Dinámica de proteínas. Las proteínas en el medio fisiológico no se comportan como entes rígidos. Poseen una flexibilidad y dinámica intrínseca que condiciona su estabilidad, les permite relacionarse con otras moléculas de su entorno y finalmente les capacita para ejercer su función biológica. La RMN se ha establecido en los últimos años como la técnica de elección para estudiar la dinámica de las proteínas debido al extenso rango de escalas de tiempo accesible a esta técnica (más de 12 órdenes de magnitud: de picosegundos a segundos), y a la gran resolución espacial obtenida a partir de la combinación de: (i) muestras marcadas con isótopos estables (fundamentalmente, ^{13}C y ^{15}N); y, (ii) la espectroscopía multidimensional (que en lugar de presentar todos los núcleos en una sola dimensión como ocurre en cualquier espectroscopía habitual, los desdoble en dos, tres o incluso cuatro dimensiones).

Las diferentes técnicas de RMN se aplican en función del rango de tiempo en el que se desee obtener información y del tipo de movimiento de interés:

(a) *Estudio de movilidad global de la proteína.* En estos casos, se considera a la molécula como un ente único (sólido rígido) y pueden estudiarse

tanto los movimientos de difusión traslacional como los de difusión rotacional, cuya naturaleza viene fuertemente determinada por la forma de la molécula. En el primer caso, el cálculo del coeficiente de difusión por RMN (las llamadas técnicas DOSY, acrónimo de *Difusión Ordered Spectroscopy*), permite además una estimación del radio de giro de la proteína y por consiguiente del peso molecular aparente en disolución (de hecho las técnicas DOSY se han usado junto con la ultracentrifugación analítica para determinar el estado de oligomerización de algunas biomoléculas e incluso en la determinación de la constante de afinidad de dicho equilibrio de auto-asociación). Para el segundo caso, la información del tiempo de correlación global (normalmente en el rango 5-50 ns) se obtiene a partir del análisis de los tiempos de relajación (el tiempo de correlación de una molécula es el tiempo que tarda en girar un radián).

(b) *Estudios encaminados a la caracterización de la dinámica interna de la proteína a nivel de resolución atómica.* En esta área es donde la RMN ha alcanzado el máximo desarrollo en los últimos tiempos. La dinámica interna de las proteínas no es sólo importante para su función biológica, sino que también lo es en gran medida para su estabilidad. En el estado desplegado las proteínas presentan un contenido entrópico muy elevado, ya que no existen restricciones estructurales que restrinjan la conformación de determinados enlaces. El proceso de plegamiento (de empaquetamiento de las cadenas laterales de los residuos que forman una proteína) introduce este tipo de restricciones que conllevan una pérdida

de entropía. Este coste entrópico se mitiga en parte, gracias a que muchas cadenas laterales siguen manteniendo una amplia libertad conformacional en el estado plegado. Es por ello, por lo que dentro de este apartado pueden caracterizarse:

(1) Movimientos muy rápidos en la escala de los pico-nano segundos, más rápidos que el tiempo de correlación global. Para su determinación, desde el punto de vista de la RMN, se aplican métodos basados en la medida de los tiempos de relajación heteronuclear (es decir de un núcleo que no es el hidrógeno), tales como los tiempos de relajación longitudinal, T_1 ; tiempos de relajación transversal, T_2 ; efecto Overhauser nuclear heteronuclear, NOE, o la llamada relajación cruzada; o bien se basan los métodos en las medidas de las constantes dipolares residuales.

(2) Movimientos lentos en la escala de los micro-mili segundos. Los movimientos de pequeña amplitud, en la escala de milisegundos a microsegundos, han demostrado ser esenciales para la función biológica de las proteínas. Esta información se obtiene a partir de las medidas de relajación transversal T_2 .

(3) Movimientos muy lentos en una escala de tiempo mayor de segundos, fundamentalmente a partir de datos de intercambio protón-deuterio monitorizadas por técnicas bidimensionales de RMN. Estas medidas permiten obtener la estabilidad local y global de la proteína y la dinámica de eventos locales. También se obtienen resultados en este rango de tiempos, a

partir de análisis de la forma de línea de las señales de RMN de átomos particulares.

Todas estas técnicas son complementarias puesto que un átomo o grupos de átomos pueden participar de varios movimientos en distintas escalas de tiempo. Desde el punto de vista experimental, las medidas para el estudio de la dinámica son laboriosas pero la información que se obtiene es extremadamente útil. Para la mayoría de estos estudios se requieren muestras marcadas con ^{13}C o ^{15}N y en algunos casos también parcialmente con ^2H . Actualmente, las facilidades de enriquecimiento en estos isótopos han disparado la posibilidad de medir dinámica en diferentes partes de la proteína, bien en el esqueleto o en las cadenas laterales de los aminoácidos (lo cual es crítico en la elucidación de los mecanismos de muchos procesos enzimáticos).

(c) *Dinámica en proteínas desnaturalizadas o parcialmente desplegadas.* En estos casos únicamente la RMN puede aportar datos acerca del comportamiento de la macromolécula en solución, y en principio, podrían aplicarse los métodos anteriormente descritos. Sin embargo para el estado totalmente desplegado no existe realmente una separación real entre lo que es un movimiento global y los movimientos internos. Recientemente se han descrito tratamientos matemáticos para analizar los datos de relajación de RMN a nivel de residuos para estos sistemas y obtener información dinámica, junto con las técnicas de dispersión de Rayos X a bajo ángulo (conocidas como SAXS).

3. Interacciones proteína-molécula. Una de las aplicaciones más interesantes de la RMN es que permite detectar complejos de proteínas con otras biomoléculas bajo condiciones fisiológicas a nivel de resolución atómica incluso si estas interacciones son débiles o transitorias (o en un sentido más amplio interacciones entre biomoléculas, aunque en lo que sigue nos centraremos en interacciones proteína-molécula, ya sea ésta una biomolécula o un compuesto orgánico sintético). De esta manera la RMN se ha erigido como la única técnica capaz de estudiar, en estas condiciones, interacciones de proteínas con pequeños ligandos con una aplicación muy efectiva en el área del diseño racional de fármacos. De hecho, numerosas empresas farmacéuticas han incorporado estrategias basadas en la RMN en sus programas de descubrimiento y diseño de fármacos, para realizar cribado de compuestos provenientes de los laboratorios o de las fuentes naturales. El éxito de estos métodos se debe a que estos análisis basados en RMN son compatibles y sinérgicos con la química médica y combinatoria, con el diseño basado en estructura y con la genómica estructural. La RMN también es única para el estudio de interacciones que involucren proteínas desnaturalizadas o parcialmente desplegadas ya que la información a nivel atómico de estas biomoléculas es imposible de obtener por otros métodos biofísicos.

Los resultados que se obtienen mediante RMN permiten detectar la existencia de reconocimiento molecular entre dos especies, conocer en que regiones del ligando y receptor

tiene lugar la interacción e incluso cuáles son las conformaciones bioactivas de ambas especies (sin necesidad de conocer en muchos casos la estructura de ambas moléculas). Vamos a describir brevemente diferentes aproximaciones experimentales en función del tipo de complejo a estudiar y de la información que se desee o pueda obtenerse.

(a) Para los estudios en los que interviene una proteína y un ligando de bajo peso molecular se siguen dos aproximaciones generales:

(1) Métodos de RMN que permiten detectar la existencia de interacción observando las señales del ligando: medidas basadas en la relajación transversal (T_2); en la relajación longitudinal (T_1); difusión; transferencia de magnetización intramolecular; transferencia de saturación intermolecular; waterLOGSY (a través de las moléculas de agua que quedan atrapadas en la interfase de unión entre ambas moléculas); y bombeo de NOE.

(2) Métodos de RMN que permiten detectar la existencia de interacción observando las señales del receptor. Estos métodos están basados fundamentalmente en la perturbación del desplazamiento químico de las señales del receptor (son lo que se conocen como técnicas SAR, acrónimo de *Structure Activity Relationships*).

Ambas aproximaciones son complementarias, tienen rangos de aplicación diferentes y presentan diferentes ventajas y desventajas. Normalmente cuando se observa el ligando no se requiere el uso de material enriquecido en isótopos estables (habitualmente ^{13}C o ^{15}N),

aunque existen algunos ejemplos en la literatura con ligandos marcados. Por el contrario, todos los métodos que se aplican observando el receptor se llevan a cabo a partir de espectros de RMN heteronuclear en muestras de proteína marcadas con ^{15}N o con ^{13}C , bien de forma uniforme o con marcaje selectivo (por ejemplo, etiquetando algunos amino-ácidos tipo).

(b) En cuanto a los estudios por RMN de interacciones entre macromoléculas, existen ejemplos en la bibliografía tanto de interacciones proteína-proteína como de complejos proteína-ácido nucleico (RNA o DNA). En todos los casos se siguen aproximaciones parecidas a las descritas en el apartado 3.a.2 arriba mencionado). Recientemente, para este tipo de complejos se viene utilizando información derivada de constantes dipolares residuales. Si lo que se desea es la estructura 3D del complejo completo se seguirán los protocolos habituales para la elucidación de proteínas por RMN ya sea desde el punto de vista homonuclear (el menos usado debido a la complicación, en la mayoría de los casos, del espectro resultante del complejo) o heteronuclear (marcando alguno o ambos de los componentes del complejo con el heteronúcleo adecuado).

(c) En cualquier caso, tanto si se trata de un complejo entre dos macromoléculas o de una proteína y un ligando pequeño, la RMN permite obtener la estructura tridimensional en disolución acuosa del mencionado complejo siempre que: (i) el tamaño molecular sea accesible (con los más altos campos disponibles y la tecnología de sondas más moderna); (ii) la

afinidad lo suficientemente grande; y (iii) la constante cinética de formación del complejo (k_{on}) sea rápida. Normalmente el intentar determinar la estructura de un complejo se usa en complejos marcados selectivamente con ^{15}N y ^{13}C , alguna si no las dos de las biomoléculas (por ejemplo en interacciones proteína-proteína o proteína-ácido nucleico) y utilizando secuencias de pulsos que permiten diferenciar las señales de RMN que provienen de una unidad del complejo o de la otra (caso de que no se usen ambas biomoléculas marcadas: es decir se filtran las señales de la biomolécula según esté marcada en un isótopo o en otro). Aún así en muchos casos, se intentan aproximaciones computacionales que alivien el problema de la asignación con uno de los compuestos formando el complejo; por ejemplo, un caso específico de determinación estructural se basa en la utilización inicial de estructuras conocidas del receptor libre que posteriormente se modifican mediante métodos de cálculo con restricciones experimentales (de desplazamientos químicos (las frecuencias en RMN, o de interacciones NOE) que dan cuenta de la interacción ligando-receptor obteniéndose un modelo que explique la variación de esos parámetros de RMN, y por tanto, acorde con los resultados experimentales.