

Determinación de la estructura de proteínas empleando RMN

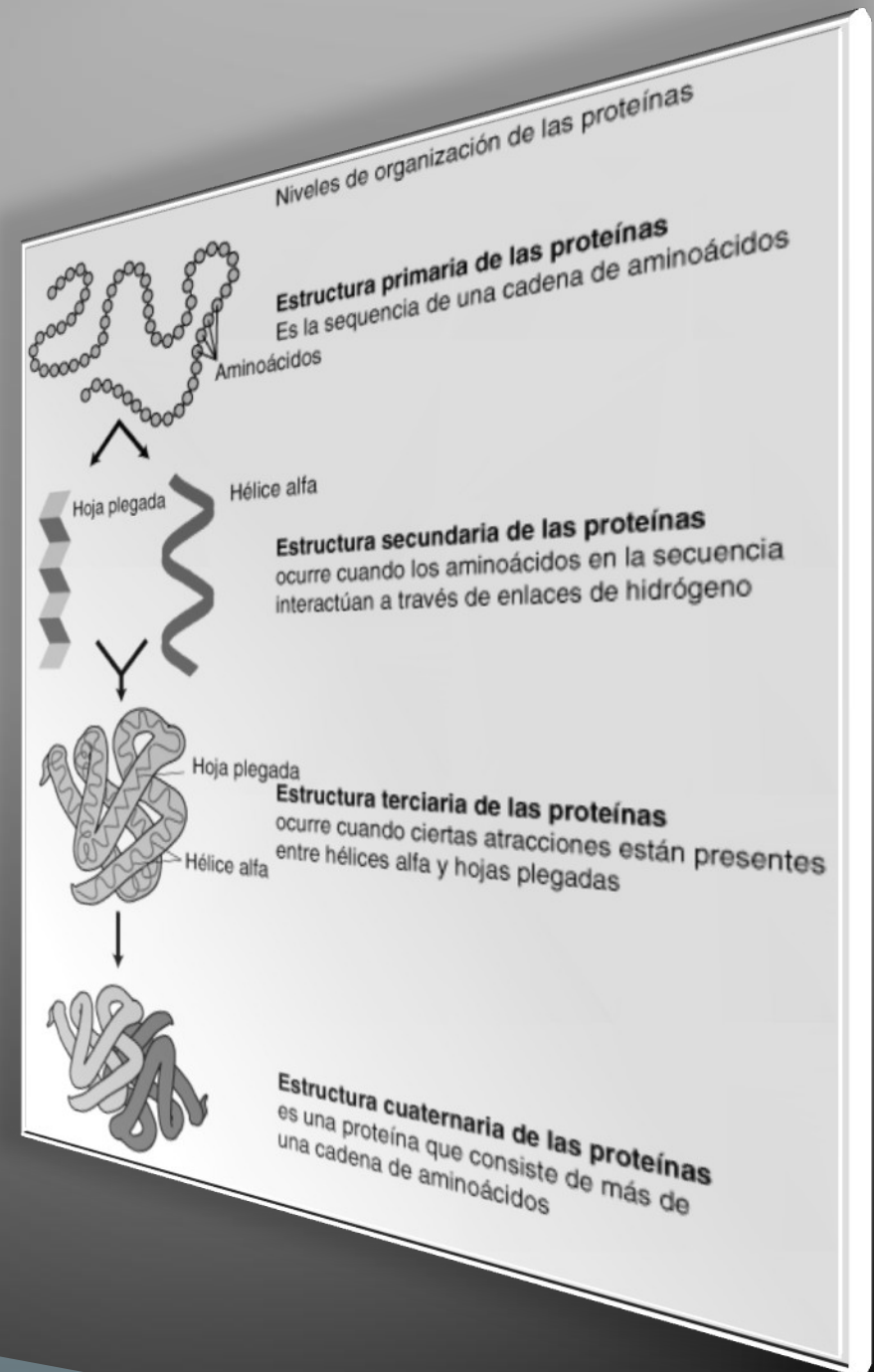
DR. GABRIEL CUEVAS
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

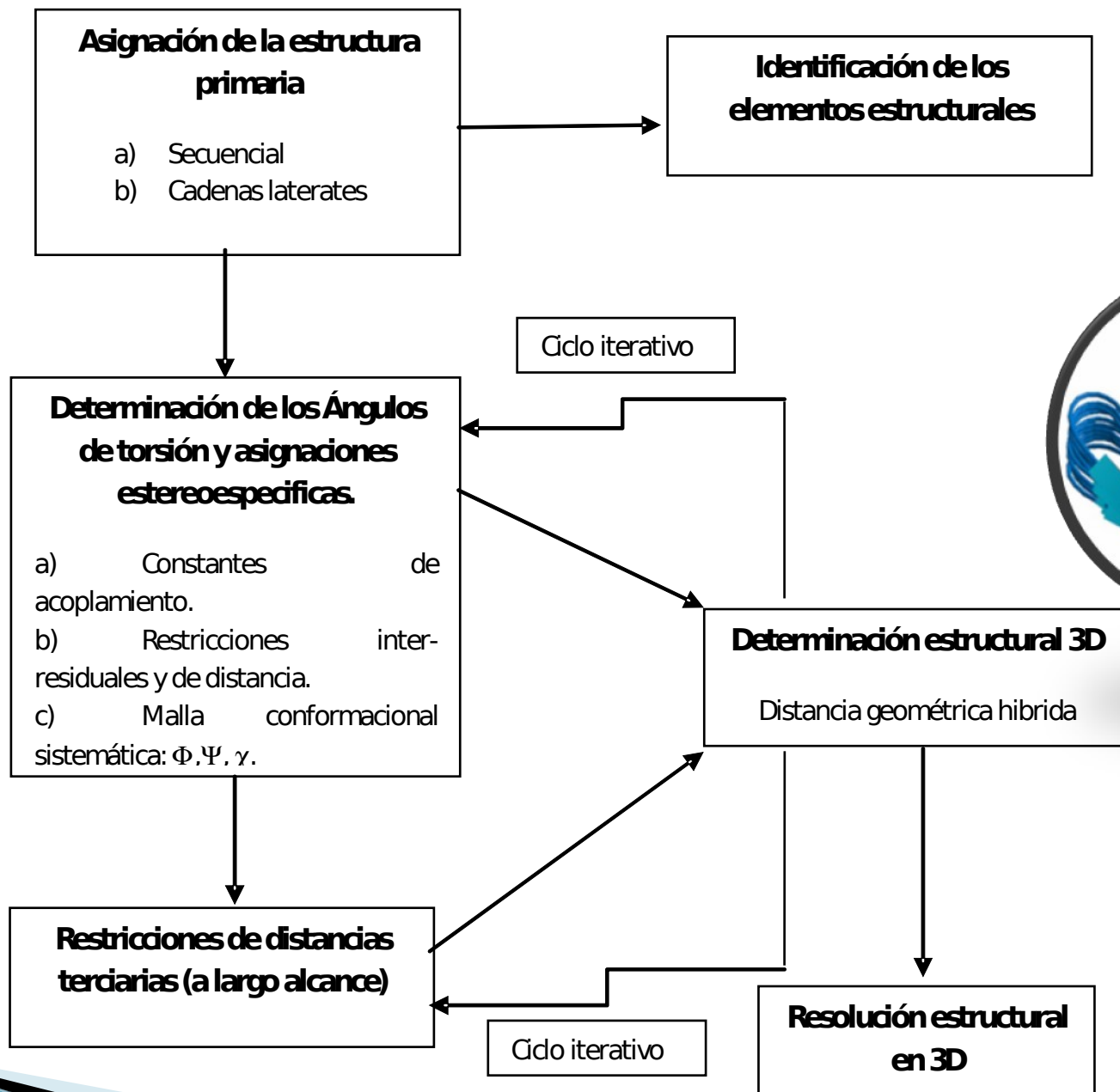
OBJETIVO

- ▶ Mostrar la aplicabilidad de la RMN a la resolución de la estructura de proteínas mostrando ejemplos en moléculas sencillas.

Proteínas

- ▶ Macromoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos.
- ▶ Realizan una enorme cantidad de funciones diferentes, entre las que destacan:
 - ✓ estructural,
 - ✓ reguladora,
 - ✓ transportadora,
 - ✓ defensiva,
 - ✓ enzimática
 - ✓ contráctil.





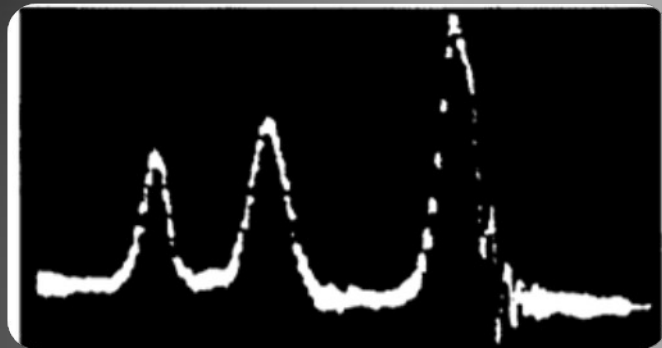
Algunos requerimientos de la muestra

- Muestras estables a temperatura ambiente.
- Concentraciones 1mM en un volumen de 0.3 – 0.5 mL.
- Dos muestras: una que se adquiere en D₂O para observar protones no intercambiables, otra 95% H₂O/5% D₂O para observar los protones intercambiables.
- Muestras de proteínas que han sido expresadas generalmente en bacterias.
- Proteínas marcadas con ¹⁵N y ¹³C (¹⁵NH₄Cl y ¹³C₆-glucosa).

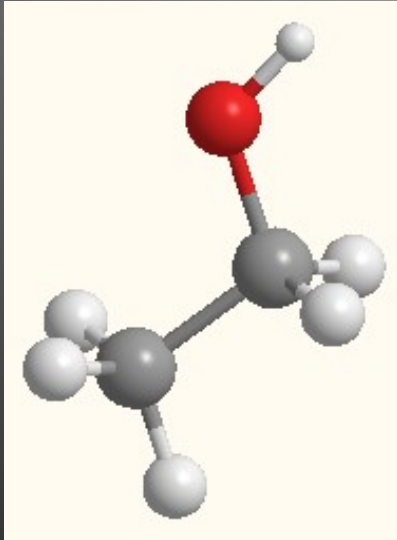
La técnica de RMN

Desarrollo de la RMN

Década	Avances Notables
1940	Primera observación de RMN en sólidos y líquidos (1945)
1950	Desarrollo del desplazamiento químico y los acoplamientos Espín-Espín como herramientas para la elucidación estructural
1960	Uso de las señales para mejorar la sensibilidad Aplicación de la TF (transformada de Fourier) mejora de la relación señal-ruido Aplicación del NOE para la elucidación estructural
1970	Uso de los imanes superconductores en combinación con la TF
1980	Desarrollo de técnicas bidimensionales y de secuencias de pulsos complejas Espectroscopia automatizada
1990	Aplicación de los gradientes de pulso Uso de técnicas espectroscópicas combinadas CL-RMN (cromatografía de líquidos-RMN)
2000	Uso de criosondas de alta sensibilidad Uso de equipos con protección externa que impiden efectos en el campo magnético (menor a 1 m) Desarrollo de microtubos para disminuir la cantidad de muestra
2010	Desarrollo de procesamiento de datos de forma paralela y más rápida



- ▶ Primer espectro de “alta resolución” de ^1H del etanol a 30 MHz.¹



- ▶ Demuestra que los desplazamientos químicos (δ) tienen una relación directa con la estructura de la molécula.

Premios Nobel y la RMN



Felix Bloch
Stanford, USA
PN Física 1952



Edward Mills Purcell
Harvard, USA
PN Física 1952



Richard R. Ernst
ETH, Zürich (Suiza)
PN Química 1991



Kurt Wütrich
ETH, Zürich (Suiza)
PN Química 2002

Premios Nobel y la RMN



Paul Lauterbur

Illinois, USA

PN Medicina 2003



Peter Mansfield

Nottingham, UK

PN Medicina 2003



**Aleksei
Abrikosov**

Argonne, USA

PN Física 2003



Vitaly Ginzburg

Moscú, Rusia

PN Física 2003



Anthony Leggett

Urbana, USA

PN Física 2003

¿Qué es la RMN?

- Todos los núcleos que poseen un número impar de protones o neutrones tienen un momento magnético y un momento angular, por lo cual, tienen un espín > 0 .
- Los núcleos más empleados en RMN son el protón (^1H , el isótopo más sensible en RMN) el ^{13}C y el ^{15}N .

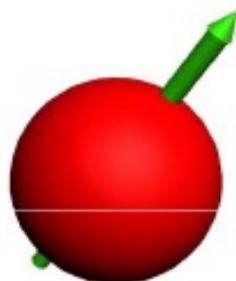
Momento Magnético Nuclear

*En su movimiento de espín, el núcleo generará un *Momento Magnético Nuclear* μ asociado, cuya magnitud dependerá de la carga y dotación nucleares:

μ

$$\mu = \gamma P$$

, en donde γ  relación giromagnética



Propiedades nucleares de los núcleos importantes en RMN de compuestos orgánicos

Núcleo	nº cuantico de spin I	μ (unidades de μ_N)	γ (10^8 rad. $T^{-1} s^{-1}$)	ν_0 (Mz a B_0 de 1T)	Sensibilidad relativa a campo constante.	Abundancia natural (%)	Momento cuadrupolar (e 10^{-28} m ²)
¹ H	1/2	2.79277	2.675	42.577	1.000	99.98	
² H	1	0.85735	0.411	6.536	0.009	0.016	0.003
¹⁰ B	3	1.8007	0.288	4.575	0.020	18.83	0.111
¹¹ B	3/2	2.6880	0.858	13.660	0.165	81.17	0.036
¹³ C	1/2	0.70216	0.673	10.705	0.016	1.108	
¹⁴ N	1	0.40369	0.193	3.076	0.001	99.635	0.02
¹⁵ N	1/2	-0.28298	-0.271	4.315	0.001	0.365	
¹⁷ O	5/2	-1.8930	-0.363	5.772	0.029	0.037	-0.004
¹⁹ F	1/2	2.6273	2.517	40.055	0.834	100.0	
²⁹ Si	1/2	-0.55492	-0.531	8.460	0.079	4.70	
³¹ P	1/2	1.1316	1.083	17.235	0.066	100.0	

*En ausencia de campo magnético externo, el núcleo no adoptará dirección privilegiada alguna. El Momento Magnético asociado a su movimiento de espín podrá adoptar cualquier dirección.

- ▶ Las frecuencias a las cuales resuena un átomo dentro de una molécula son directamente proporcionales a la fuerza del campo magnético externo (B_0), de acuerdo con la ecuación de la frecuencia de precesión de Larmor.

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

Importancia de la magnitud de B_0

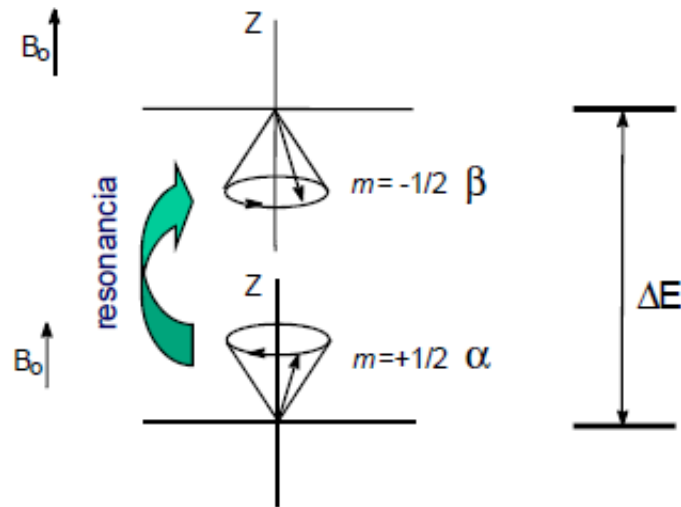
- Los campos magnéticos mayores son a menudo preferidos puesto que correlacionan con un incremento en la sensibilidad de la señal.
- El incremento del campo magnético también se traduce en una mayor resolución espectral, a través del desplazamiento químico y el efecto Zeeman



Espectrómetro RMN del Lab Nal. del Pacífico Noroccidental
(800 MHz, 18,8 T)

- ▶ La RMN estudia los núcleos atómicos al alinearlos a un campo magnético constante para posteriormente perturbar este alineamiento con el uso de un campo magnético externo (B_0), de orientación ortogonal.
- ▶ La resultante de esta perturbación es el fenómeno que explotan las distintas técnicas de RMN.

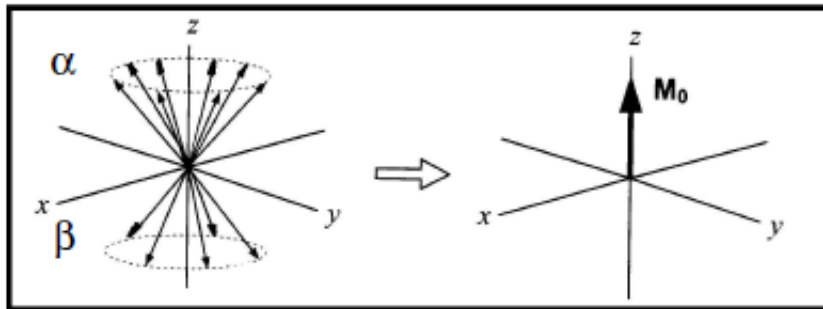
¿Qué ocurre con el núcleo?



$$\nu_{\text{reson.}} = \frac{\gamma}{2\pi} B_{\text{ef}}$$

¿Qué ocurre con una muestra macroscópica?

*Para un conjunto de espines, en el equilibrio, existirá una magnetización resultante M_0 (Magnetización longitudinal), ya que habrá un mayor número de núcleos que adoptarán la orientación paralela con B_0 (energéticamente más favorable, α), que antiparalela (β).



$$\frac{N_{\beta}}{N_{\alpha}} = e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}} = \frac{1}{e^{\frac{\Delta E}{k_B T}}}$$

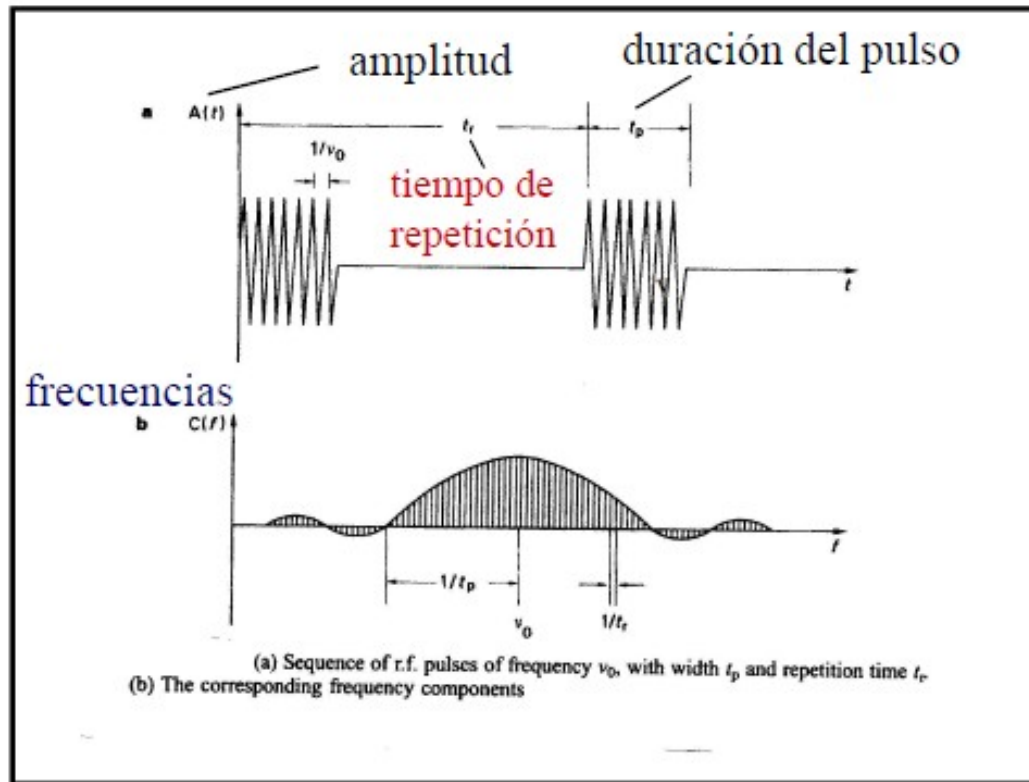
*En el equilibrio, existirá una magnetización resultante M_0 (Magnetización longitudinal)

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

- ▶ Estas frecuencias corresponden típicamente al intervalo de RF del espectro electromagnético y es la absorción de resonancia que se detecta en RMN.

Pulso de excitación

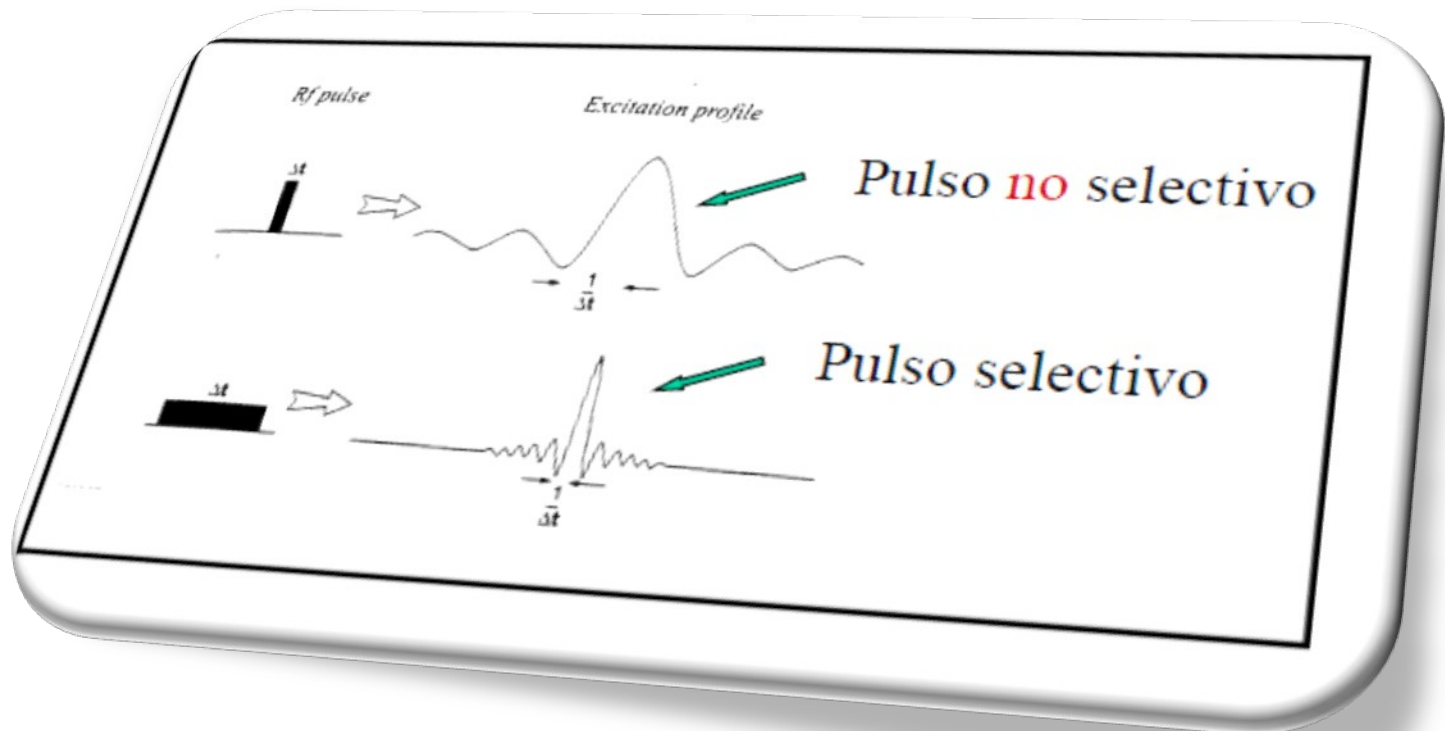
*Su misión es excitar SIMULTANEAMENTE a todos los núcleos de la muestra. Deberá abarcar un cierto intervalo de frecuencias.



Intervalo
excitado (Hz)

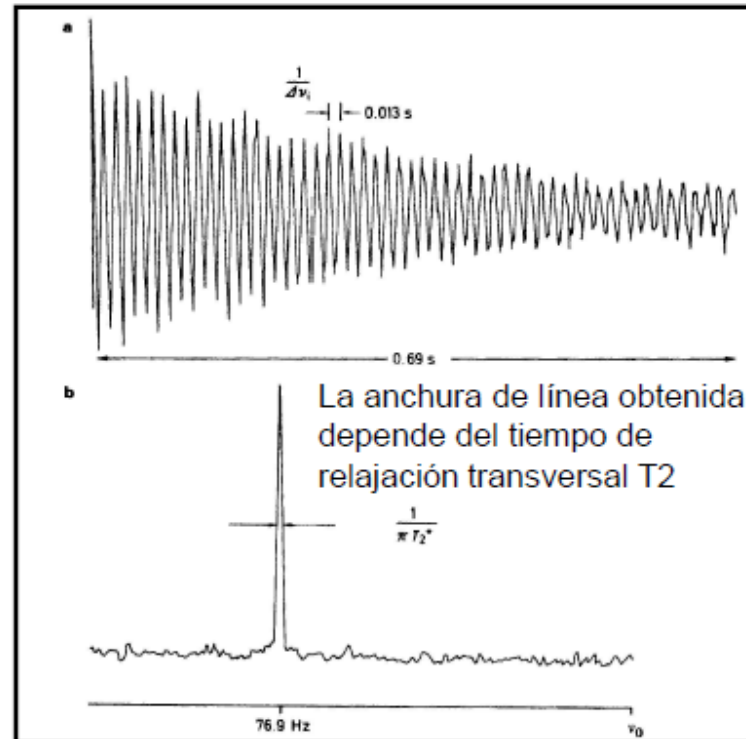
$$\nu_0 \pm \frac{1}{t_p}$$

Pulso de excitación



FID (Free Induction Decay)

*Una vez terminada la aplicación del pulso, el receptor va a detectar una señal cuya intensidad decae con el **tiempo** (FID) y cuya forma y aspecto dependen de las diferencias de frecuencia $\nu_0 - \nu_i$ de las magnetizaciones que la componen



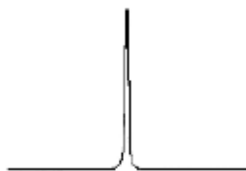
*La señal detectada es una variable dependiente del **tiempo**

*La señal detectada (fid) es una variable dependiente del **tiempo**, pero es necesario hacerla dependiente de la **frecuencia** para obtener la información **espectroscópica**

*La transformación de Fourier (FT) cambia la variable de la que depende la información.
Del dominio del tiempo se cambia al dominio de la frecuencia

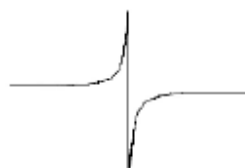
$$f(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) e^{i\omega t} dt$$

Parte real
 $\text{Re}[f(\omega)] = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) \cos \omega t dt$



Líneas de absorción

Parte imaginaria
 $\text{Im}[f(\omega)] = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) \sin \omega t dt$

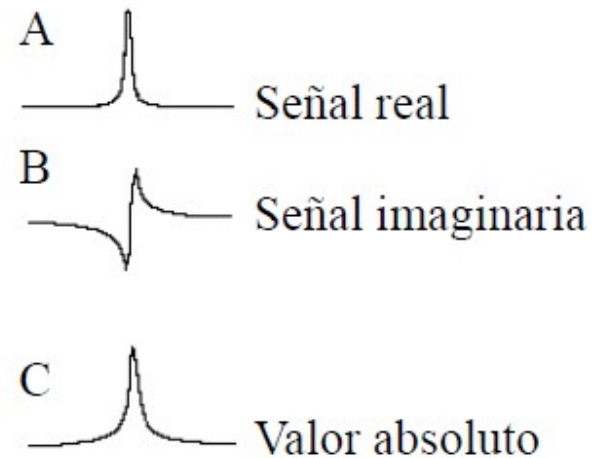
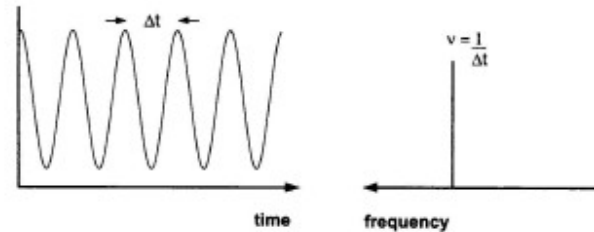
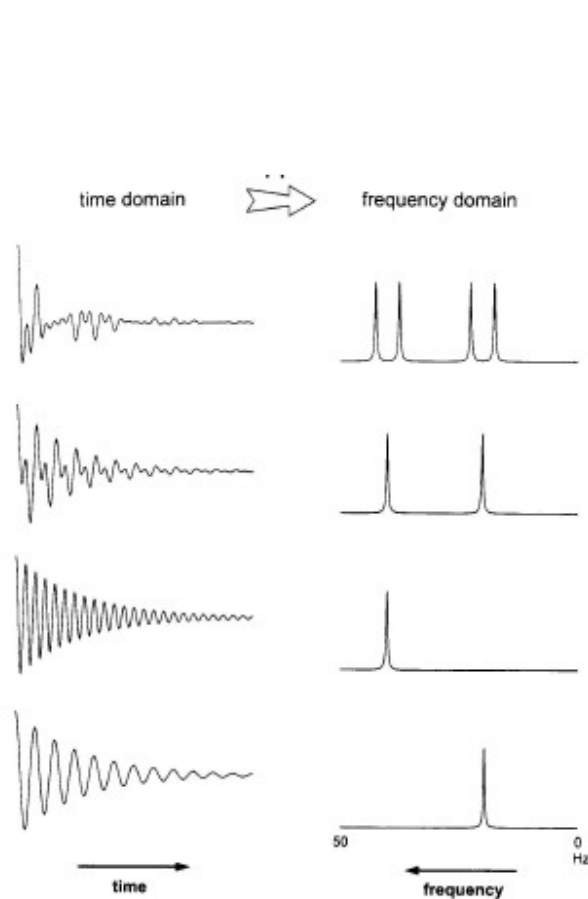


Líneas de dispersión

*Se obtiene un resultado que posee una parte real y una parte imaginaria

*Ambas partes poseen una diferencia de **fase** de 90°

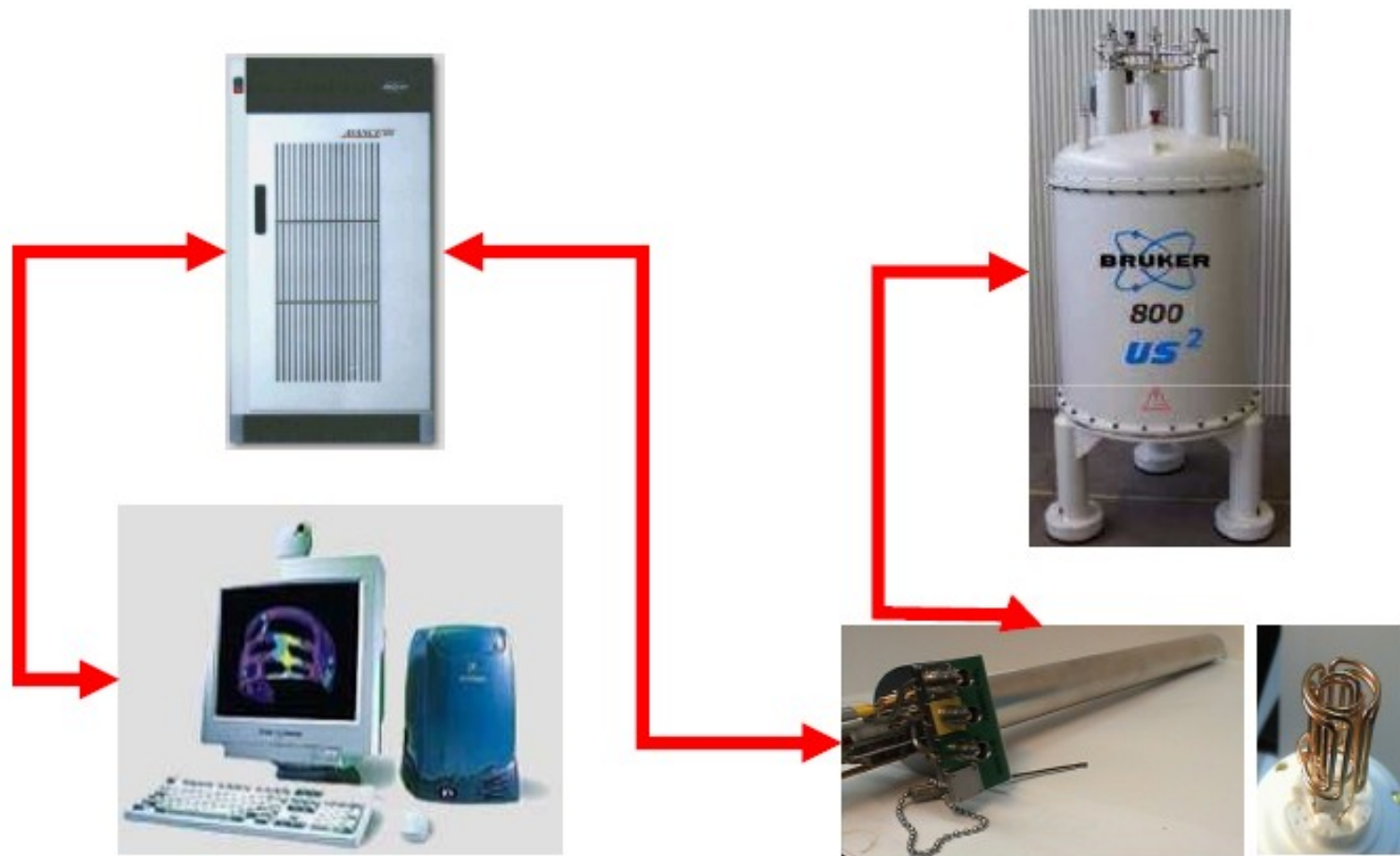
Tratamiento de la FID



$$M = \sqrt{\text{Re}^2 + \text{Im}^2}$$

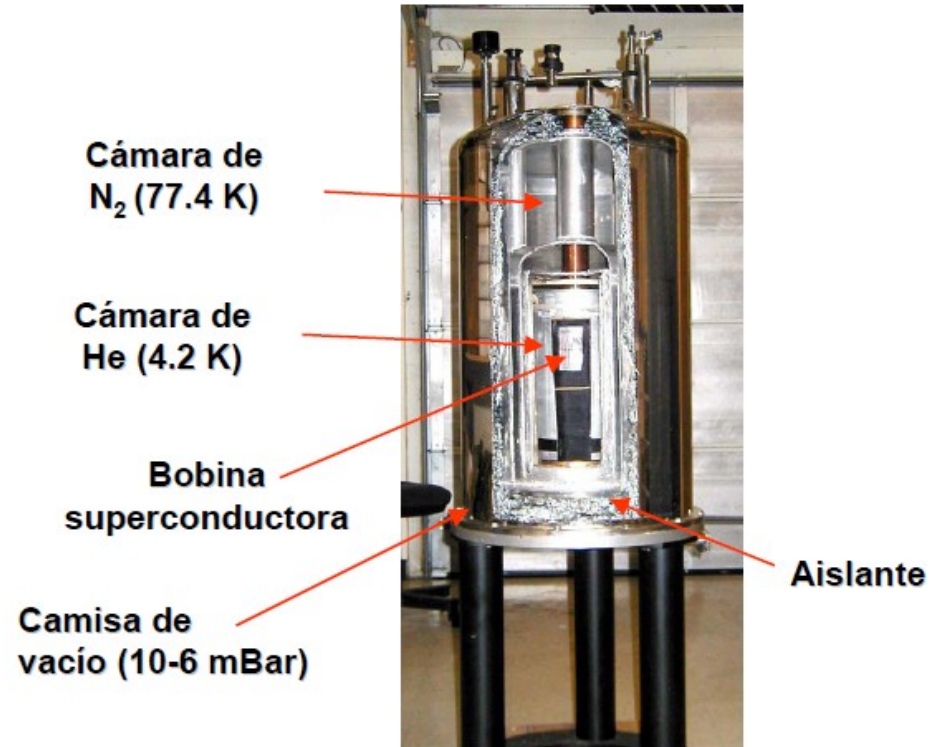
19

Para la realización de espectros de RMN es necesario:

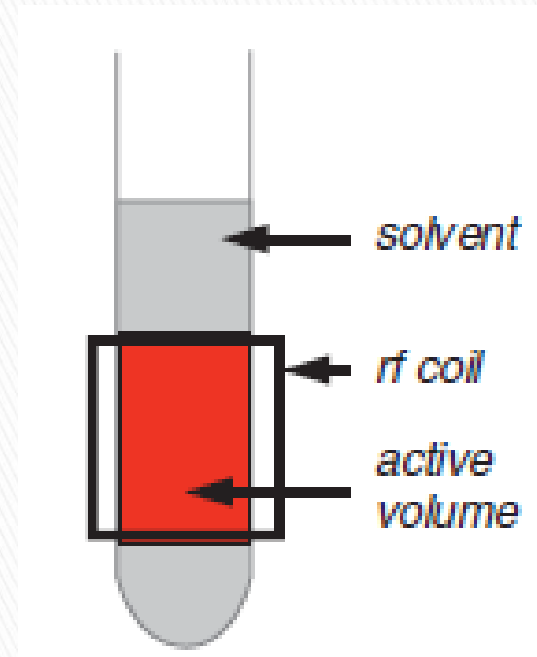
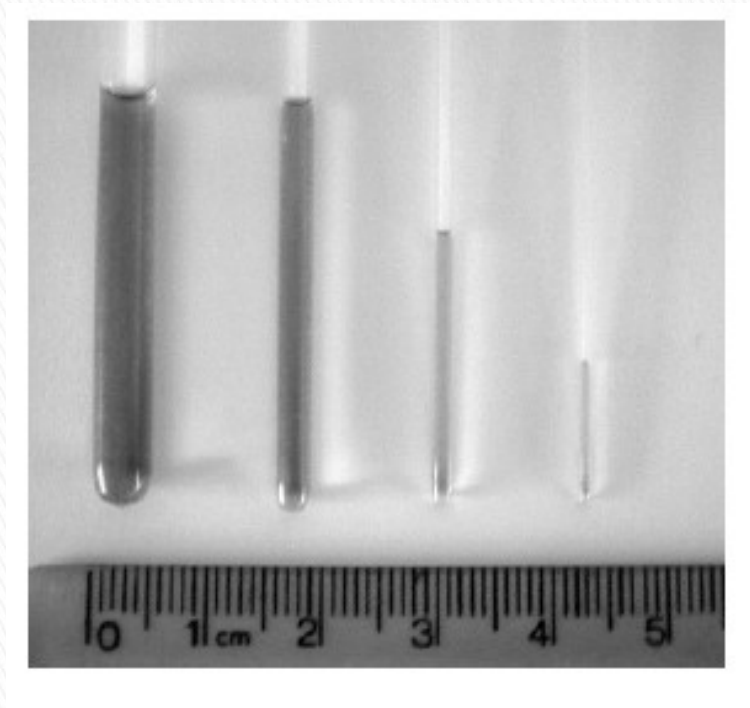


Partes del equipo de RMN

Imán

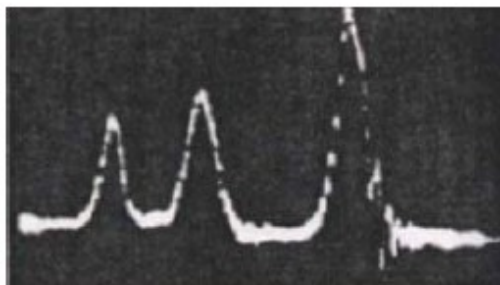


Mejorando la sensibilidad y los tubos para la muestra



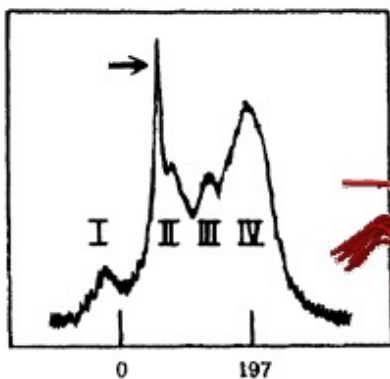
Tubos de RMN

Volumen necesario

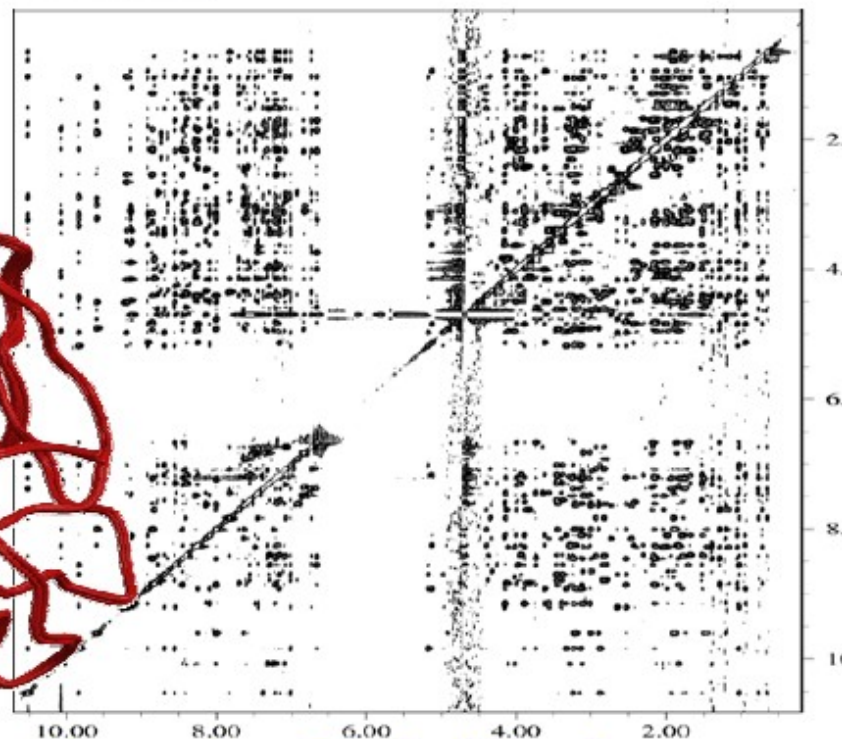


1951,
1^{er} espectro EtOH

Espectrómetro de 30 MHz

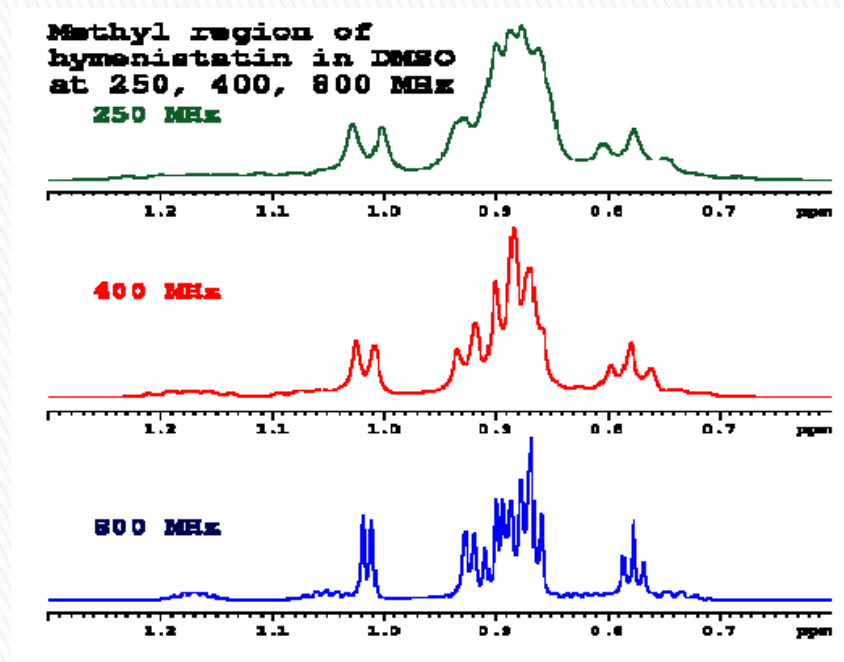
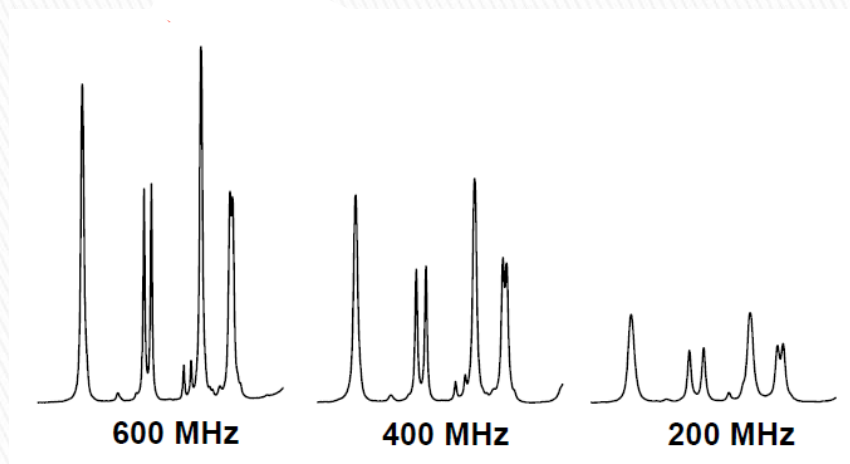


Espectro 1D de RNasa A,
40 MHz, 1957

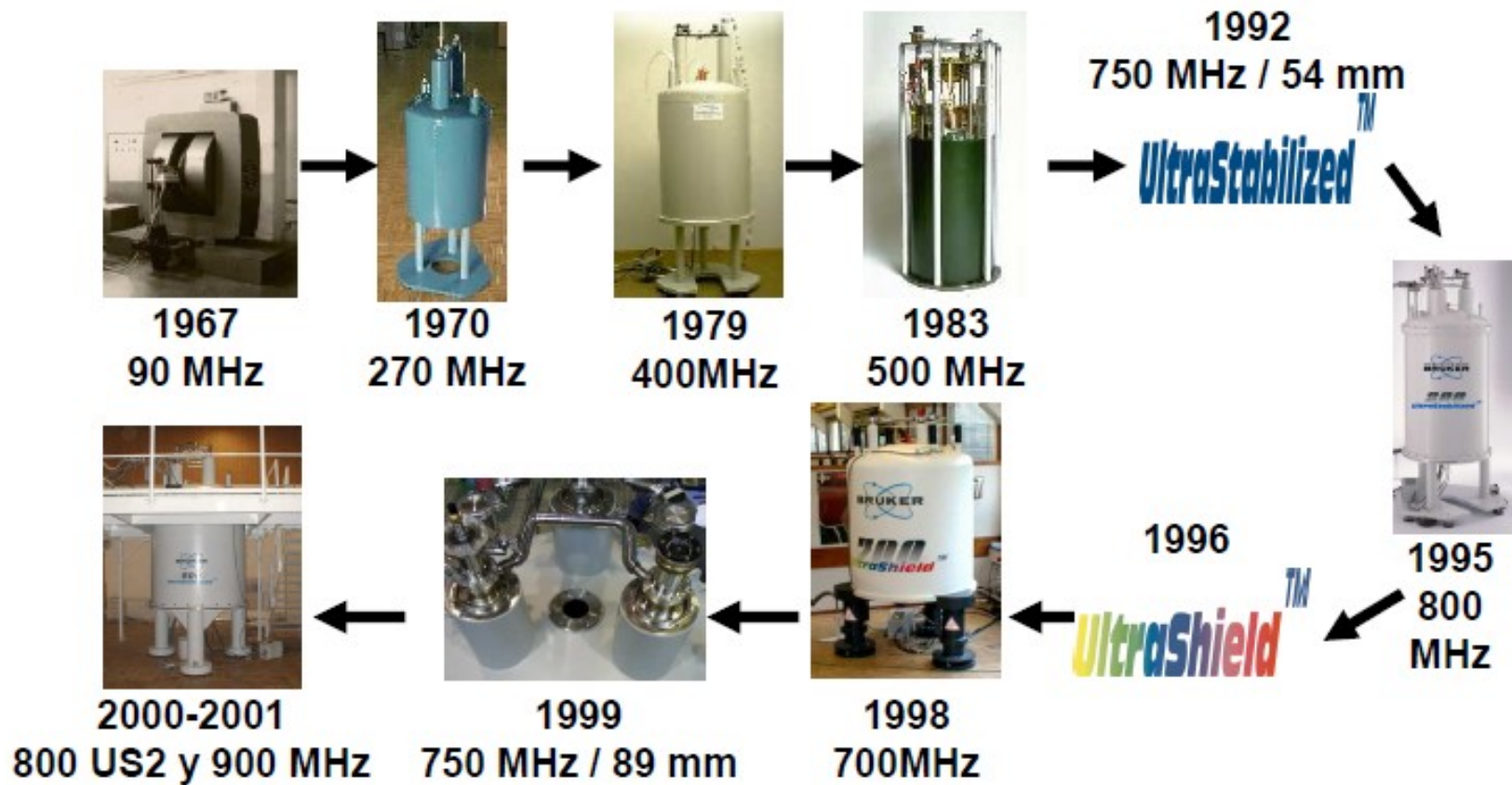


Espectro 2D de Hevein,
600 MHz, 1997

Sensibilidad al incrementar B_0



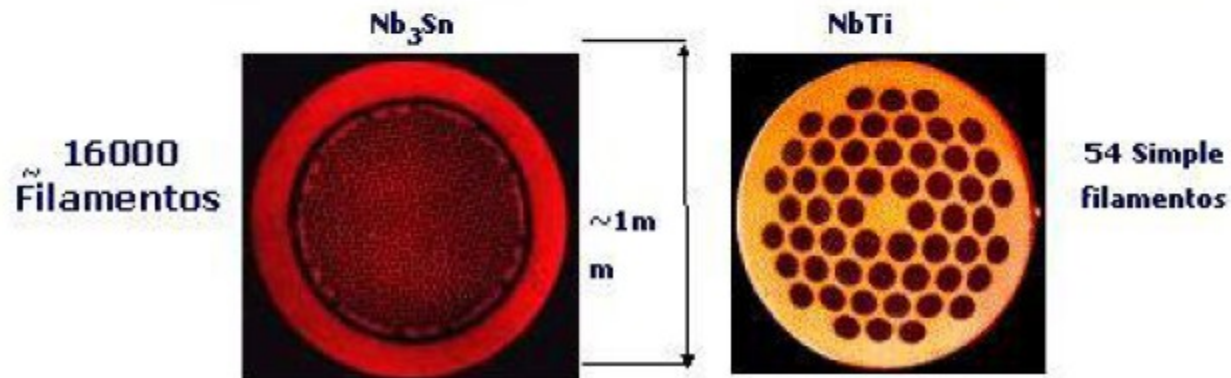
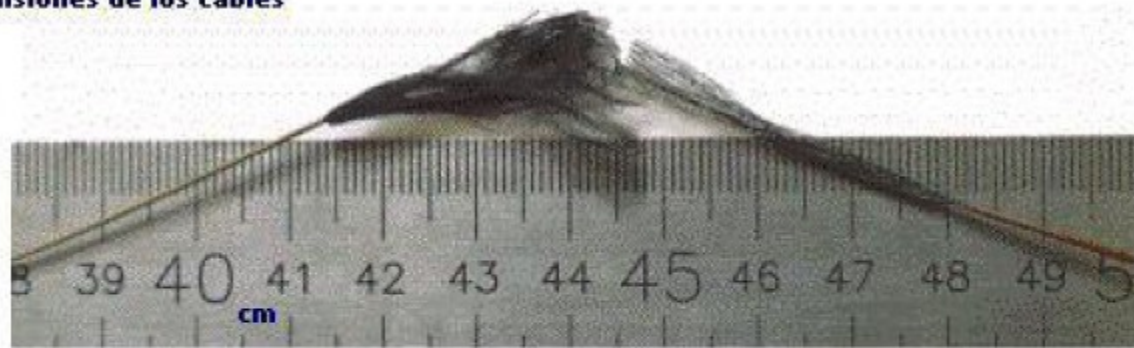
Evolución de los espectrómetros



Bobina superconductora

Detalles de cables superconductores

Dimensiones de los cables



Criosonda

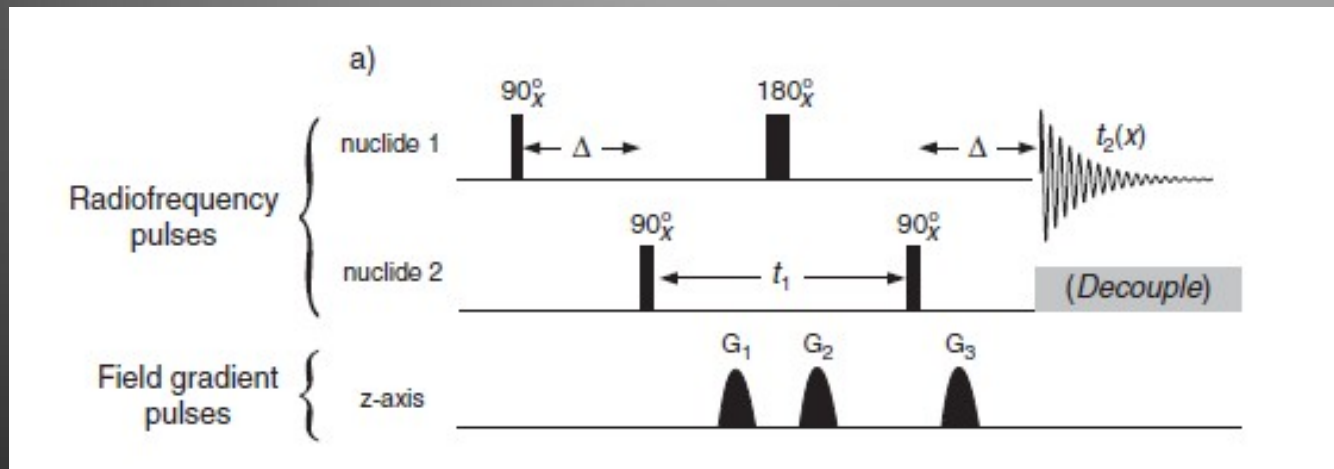
- ▶ A. estación criogénica, contiene He gas a muy baja temperatura
- ▶ B. Línea de transferencia de He gas
- ▶ C. Línea de vacío
- ▶ D. Sonda

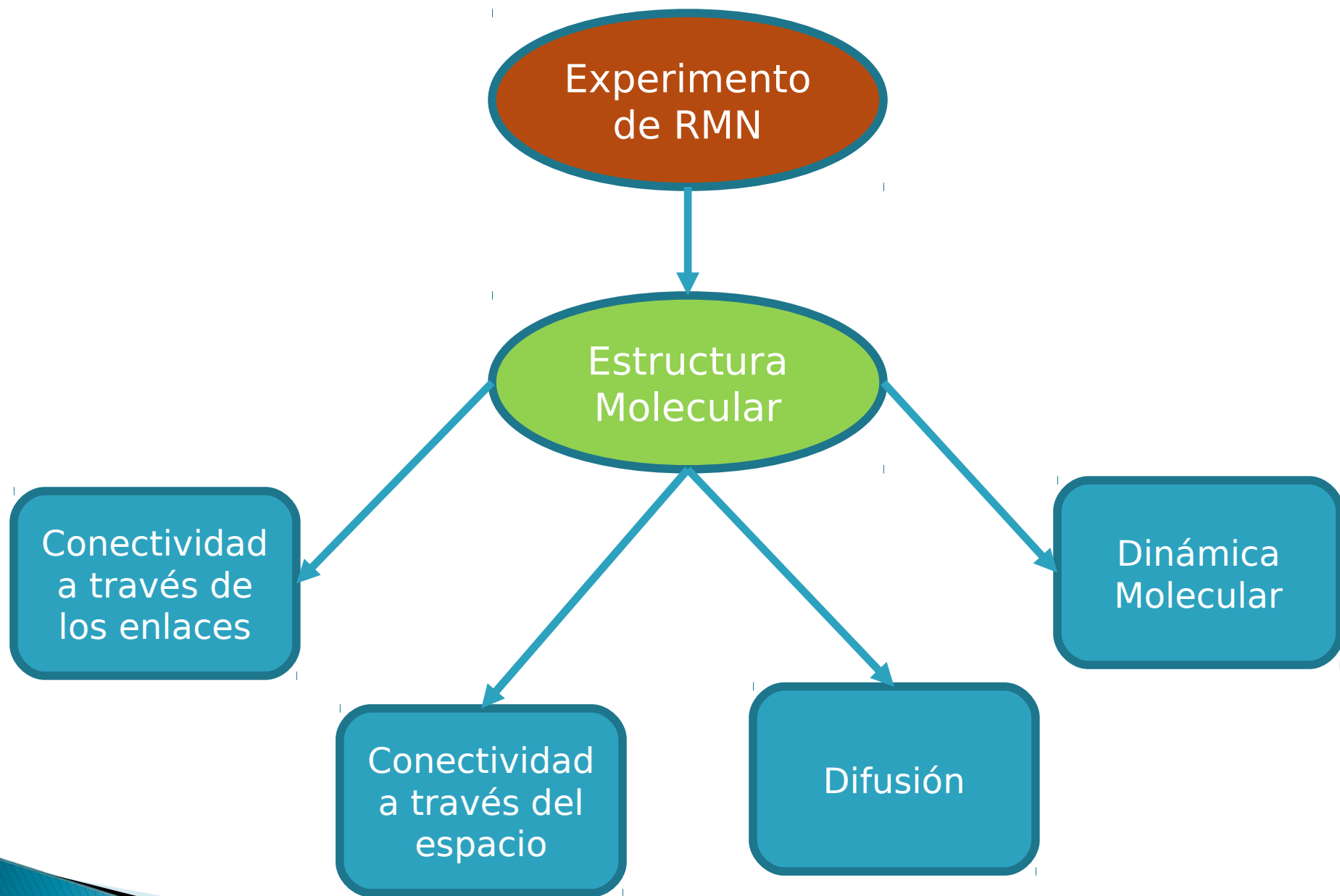


Se cuenta con las siguientes herramientas para comenzar a elucidar las estructuras, confirmar su estereoquímica o analizar su conformación

Secuencia de Pulsos

Combinaciones de estímulos de distinta intensidad para controlar la evolución de los núcleos durante su relajamiento.

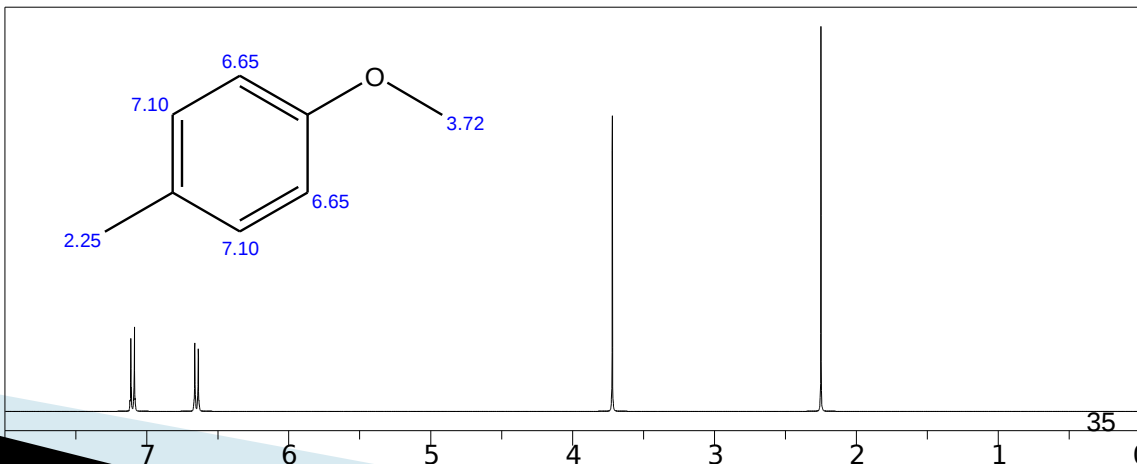
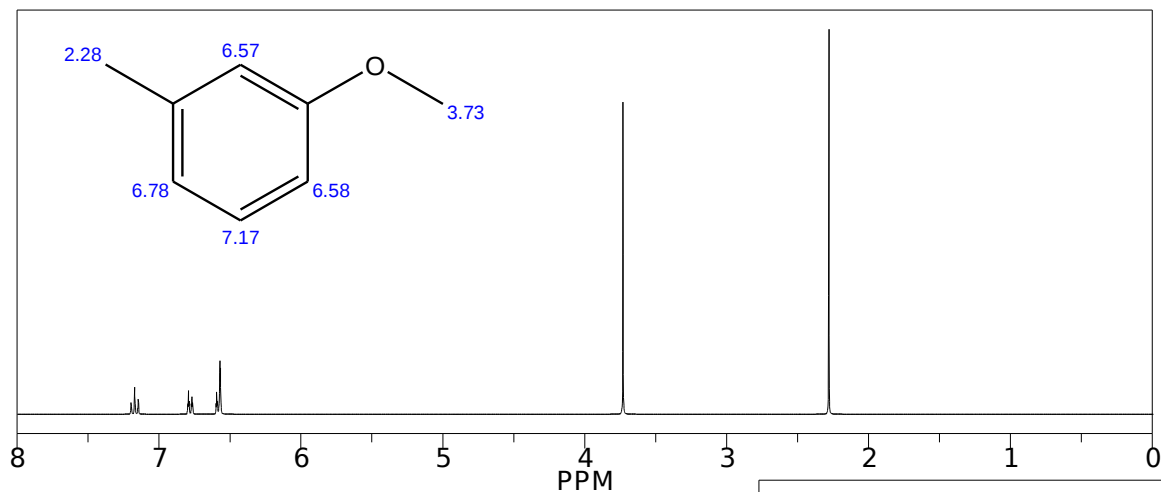
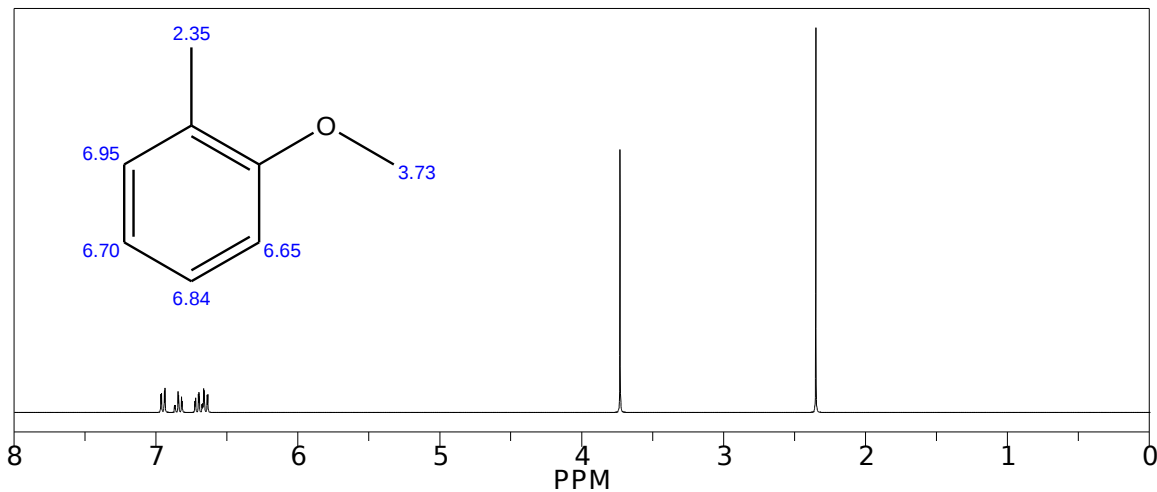




Estructura de moléculas pequeñas

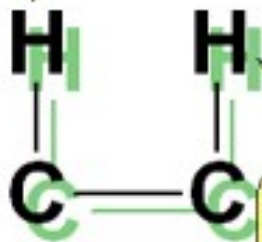
- ▶ Desplazamiento Químico (δ)
- ▶ Constante de Acoplamiento (J)
- ▶ Correlaciones a través del espacio (NOE)

Desplazamien to Químico

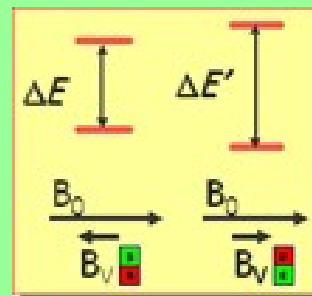


Los núcleos con momento magnético se comportan los unos con los otros como pequeños imanes que se influncian mutuamente.

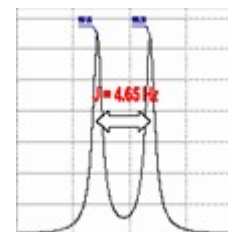
Aproximadamente el 50% de las moléculas poseen el otro protón en cada uno de los dos estados posibles



Protón que observamos



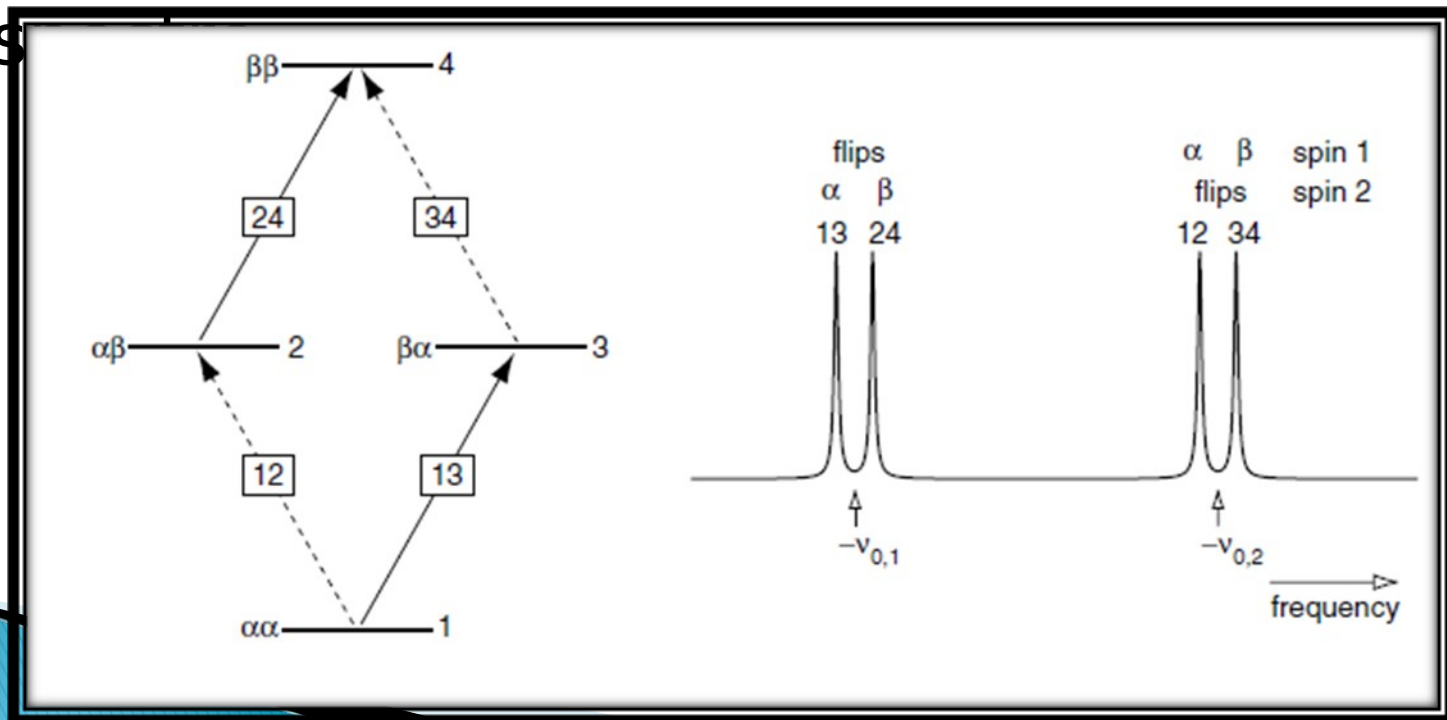
El protón que observamos sufre dos campos magnéticos diferentes:
1) En uno el campo externo B_0 se refuerza por el 50% de los núcleos alineados con él
2) En el otro, el campo B_0 sufre una pequeña merma por el 50% de los núcleos que están en su contra.



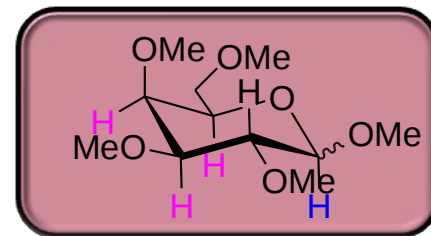
El protón que observamos aparece como un doblete debido a la influencia del protón vecino. La separación entre las señales del doblete es la constante de acoplamiento y se mide en Hz.

Constante de Acoplamiento (J)

- Acoplamiento escalar entre espines nucleares, se genera por el acoplamiento a través de los enlaces y tiene consecuencia en la multiplicidad de las señales del es

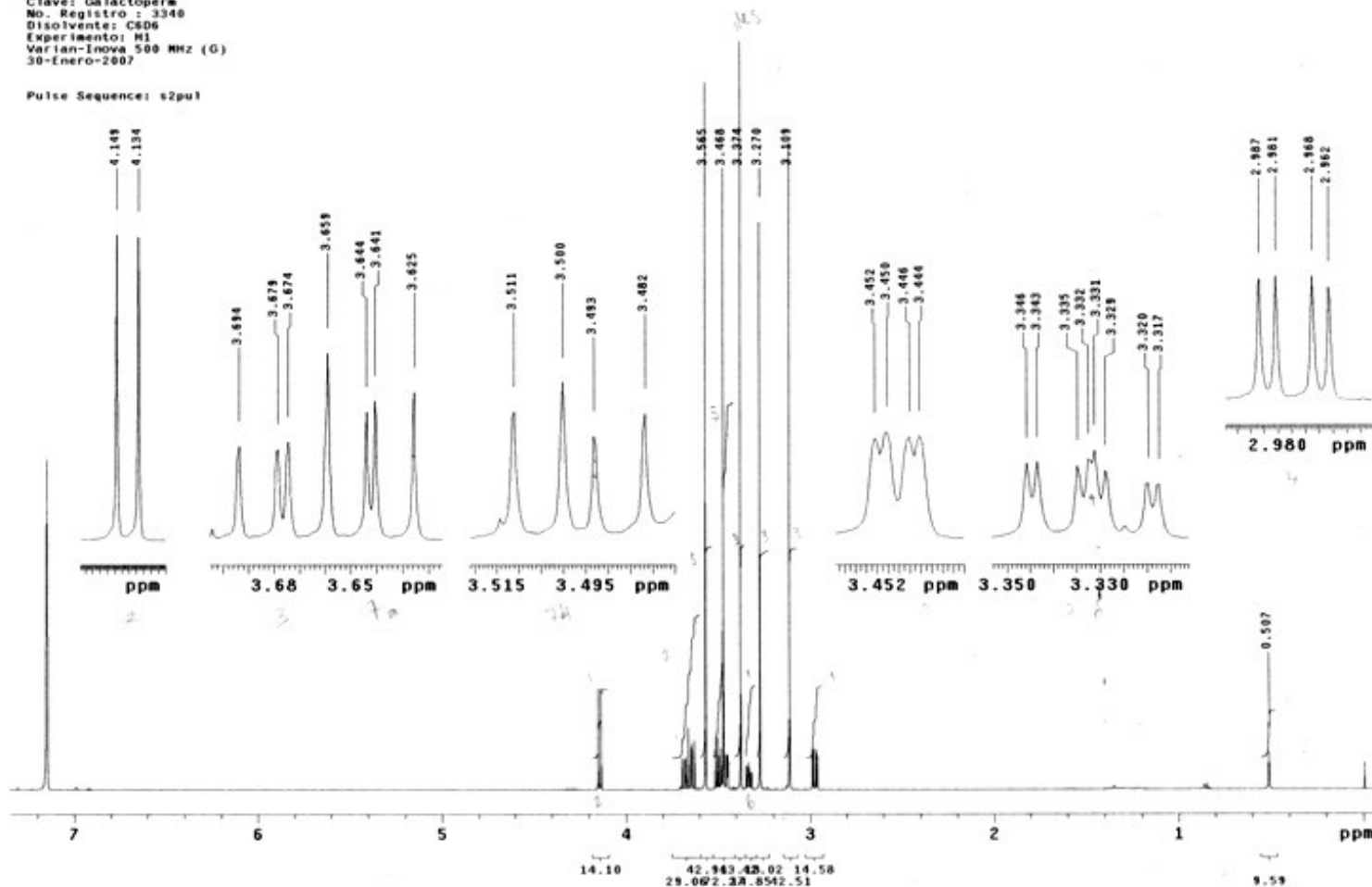


Espectro de RMN



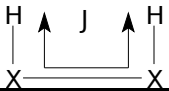
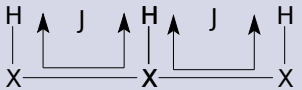
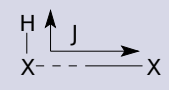
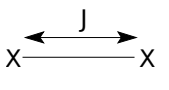
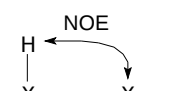
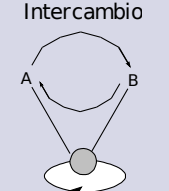
Instituto de Química UNAM (BQ)
Dr. G. Cuevas / K. Ramírez
Clave: Galactopero
No. Registro : 3340
Disolvente: CDCl₃
Experimento: M1
Varian-Inova 500 MHz (G)
30-Enero-2007

Pulse Sequence: s2pul



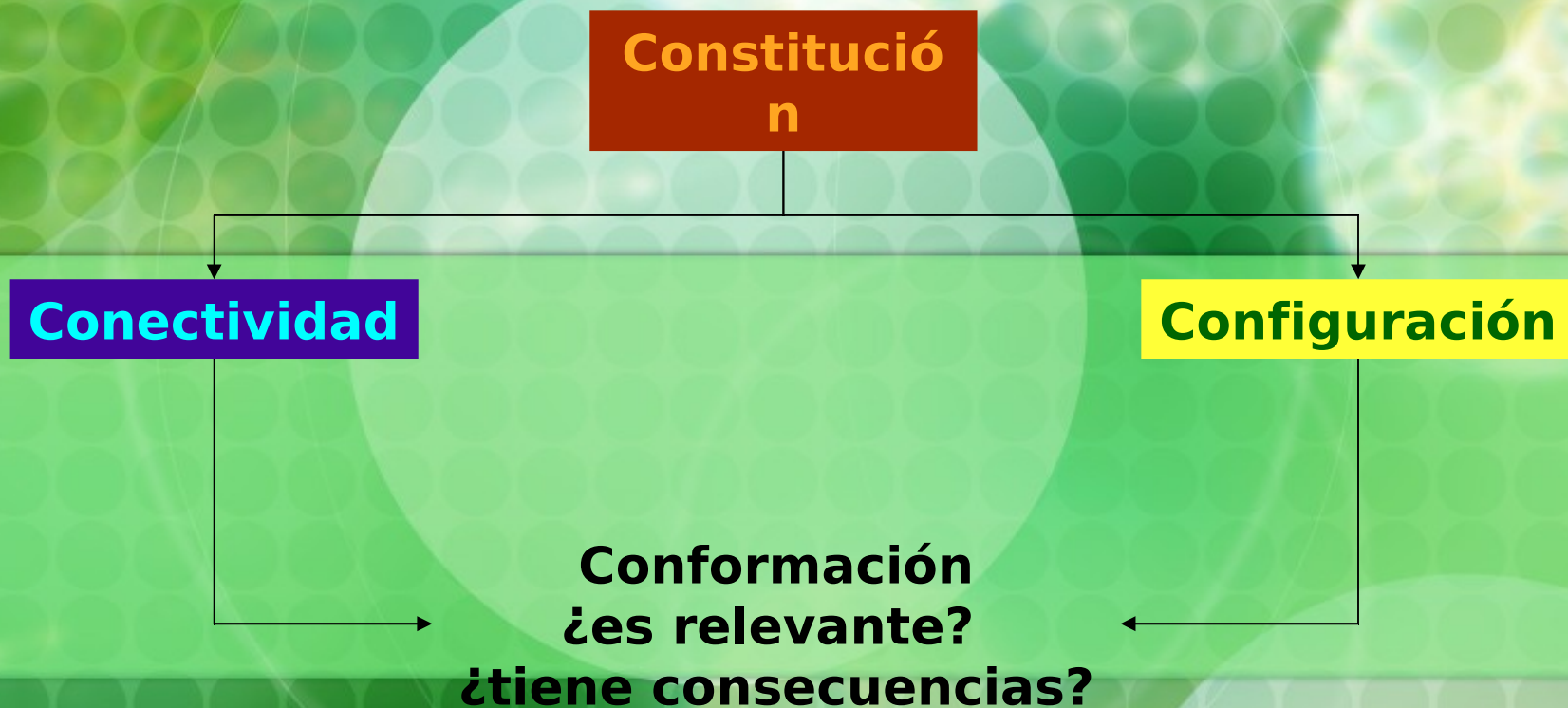
Efecto Nuclear de Overhauser (nOe)

- ▶ Cambio en la intensidad de la frecuencia de resonancia del espín A cuando se perturban los estados de equilibrio del espín próximo B.
- ▶ Este fenómeno se genera a través de la interacción dipolo-dipolo denominada relajación cruzada (*cross relaxation*) con el cual se transfiere magnetización de un espín a otro a través del espacio.

Correlación	Técnica principal	Descripción
	^1H - ^1H COSY	Acoplamiento J de protones hasta 2 o 3 enlaces
	^1H - ^1H TOCSY	Acoplamiento J de protones dentro de un sistema de espín acoplado. Los protones remotos pueden correlacionar considerando que hay una red de acoplamiento continuo entre ellos
	^1H -X HMQC ^1H -X HSQC	Acoplamientos heteronucleares de un enlace con un protón
	^1H -X HMBC	Acoplamientos heteronucleares a larga distancia con protones. Típicamente de 2 a 3 enlaces cuando X = ^{13}C
	X-X COSY X-X INADEQUATE	Sólo se utiliza COSY cuando la abundancia natural del spin de X > 20%. Puede haber problemas de sensibilidad cuando la abundancia natural de X es baja
	^1H - ^1H NOE diferencial 1/2D NOESY 1/2DROESY	Correlaciones a través del espacio. El NOE diferencial sólo aplica a moléculas de tamaño mediano con masas de 1 a 2 kDa
	^1H -X NOE diferencial 2D HOESY	Sensibilidad limitada para observar el espín X. Se debe tener cuidado para hacer un NOE específico en presencia de protones desacoplados
	1D transferencia pos saturación o inversión 2D EXSY	Intercambio de espín en diferentes locaciones químicas. El intercambio debe ser lento en la escala de NMR para poder observar resonancias separadas. El intercambio moderado a rápido requiere el análisis de la forma de las líneas

Aplicación del NOE a la estructura de la perezona

Definición de la estructura molecular.



¿Fundador del estudio biodirigido de productos naturales?

- ✓ *Raíz de Pipitzahuac*
- ✓ *Perezia cuernavacana*

Medicina tradicional indígena:

- ✓ Antihelmíntico
- ✓ Tratamiento de hemorroides

Ácido pipizahoico



Foto A. Sandoval, 1964.
Infrutescencia de *Perezia Cuernavacana* mostrando el vilano de sus flores.

• M. Aguilar-Martínez, J. A. Bautista-Martínez, N. Macías-Ruvalcaba, I. González, E. Tovar, T. Marín del Alizal, O. Collera, G. Cuevas, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 8349

Entre 1852 y hasta 1919 la molécula es objeto de varios estudios:

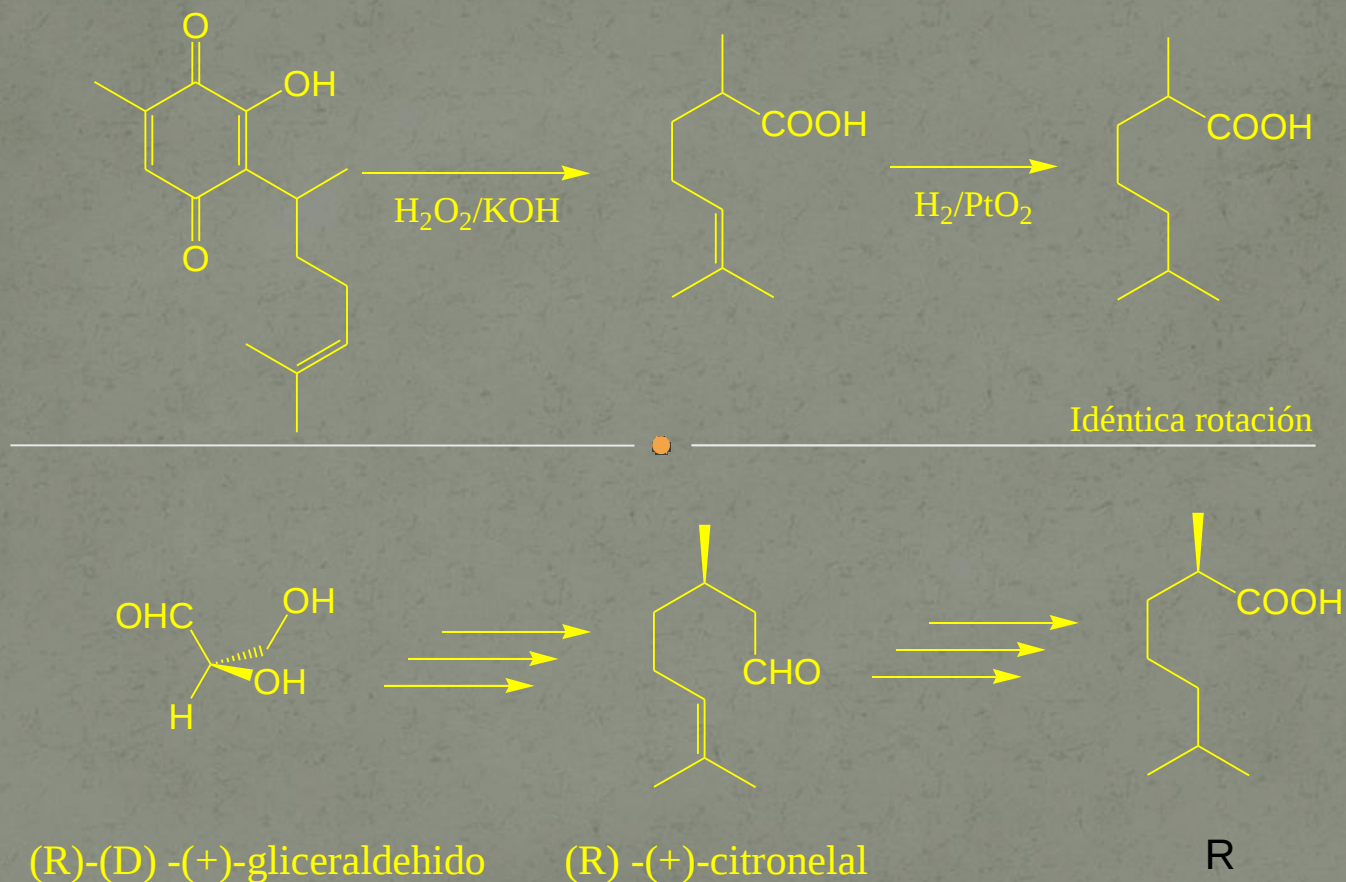
-Derivados

-Primeras Estructuras

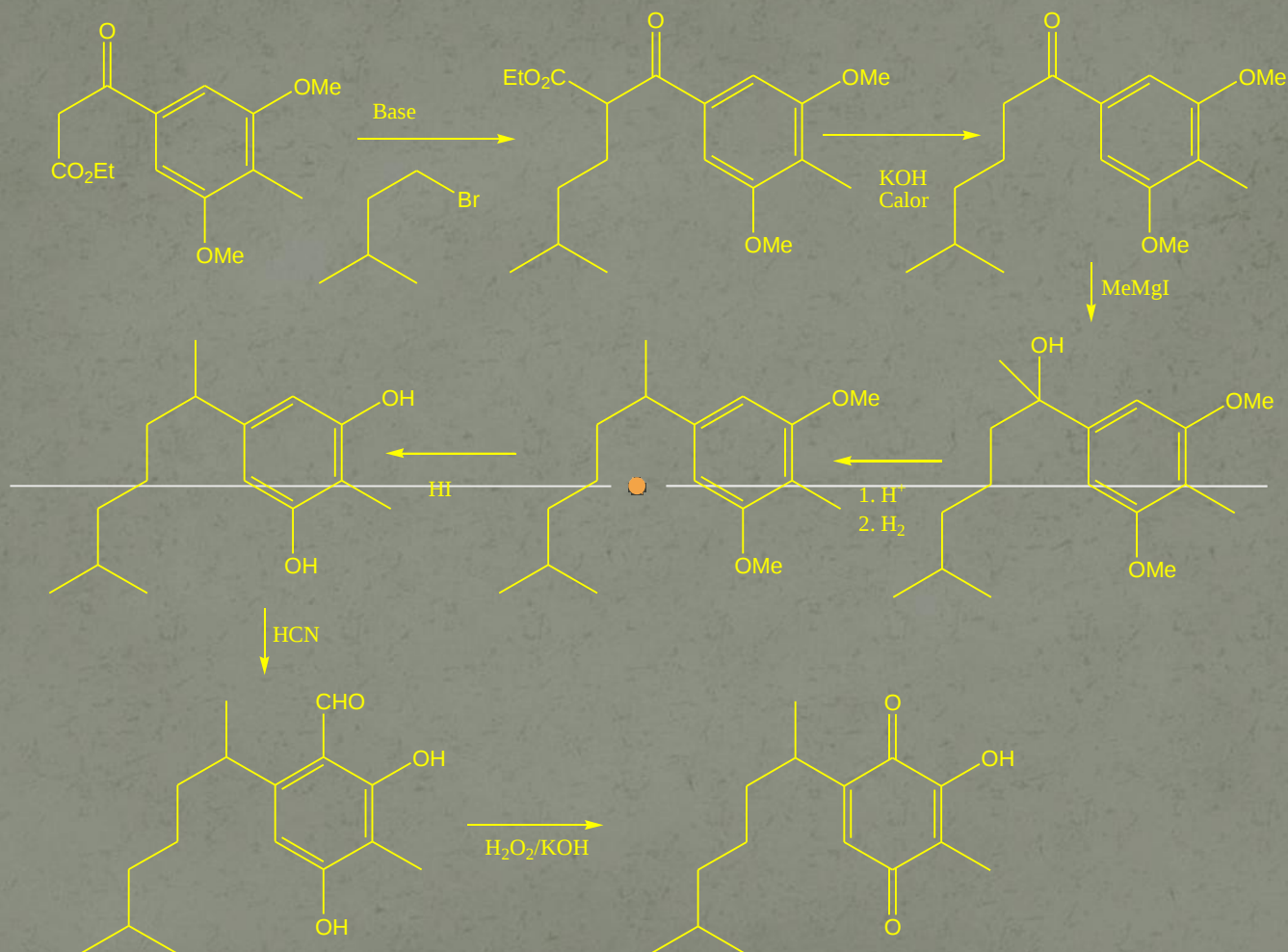
-
1. Es una quinona.
 2. Tiene dos grupos alquilo.
 3. Tiene un hidroxilo.

La configuración se resolvió primero.

Determinación de la configuración absoluta de la perezona.



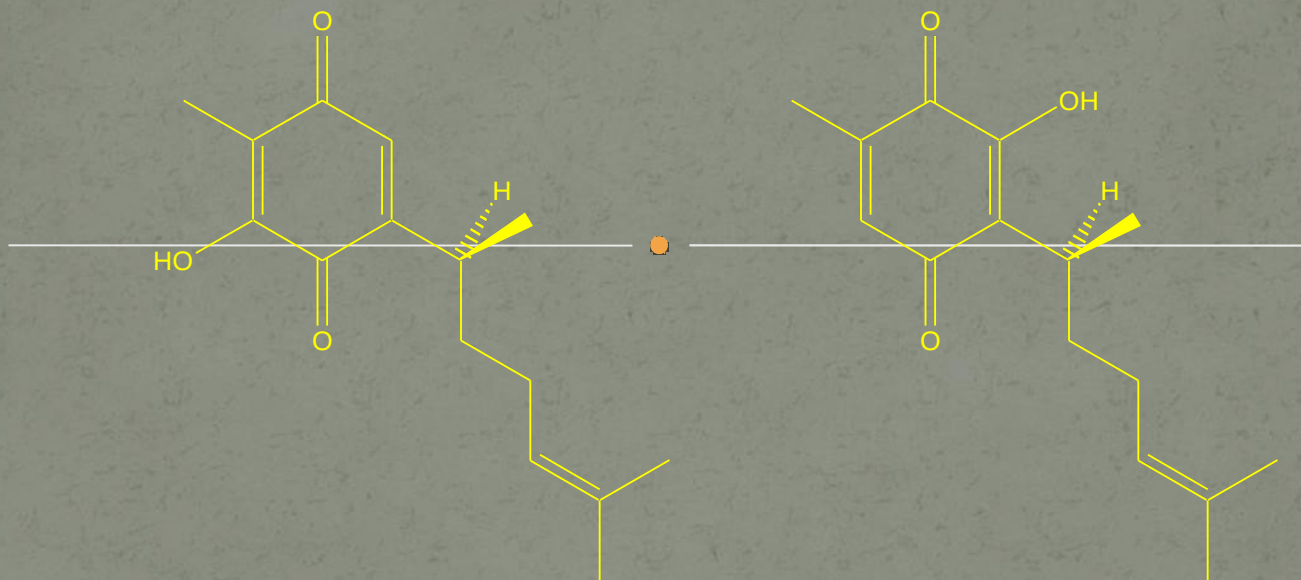
Síntesis de dihidroperezona.



Yamaguchi, K. *J. Pharm. Soc. Japan*, **1942**, 62, 491.

Pero: ¿Cuál es la conectividad?

Se sabía que era una p-quinona, con dos grupos alquilo en posición *para*, y un hidroxilo adicional dada la composición de oxígeno (O₃)

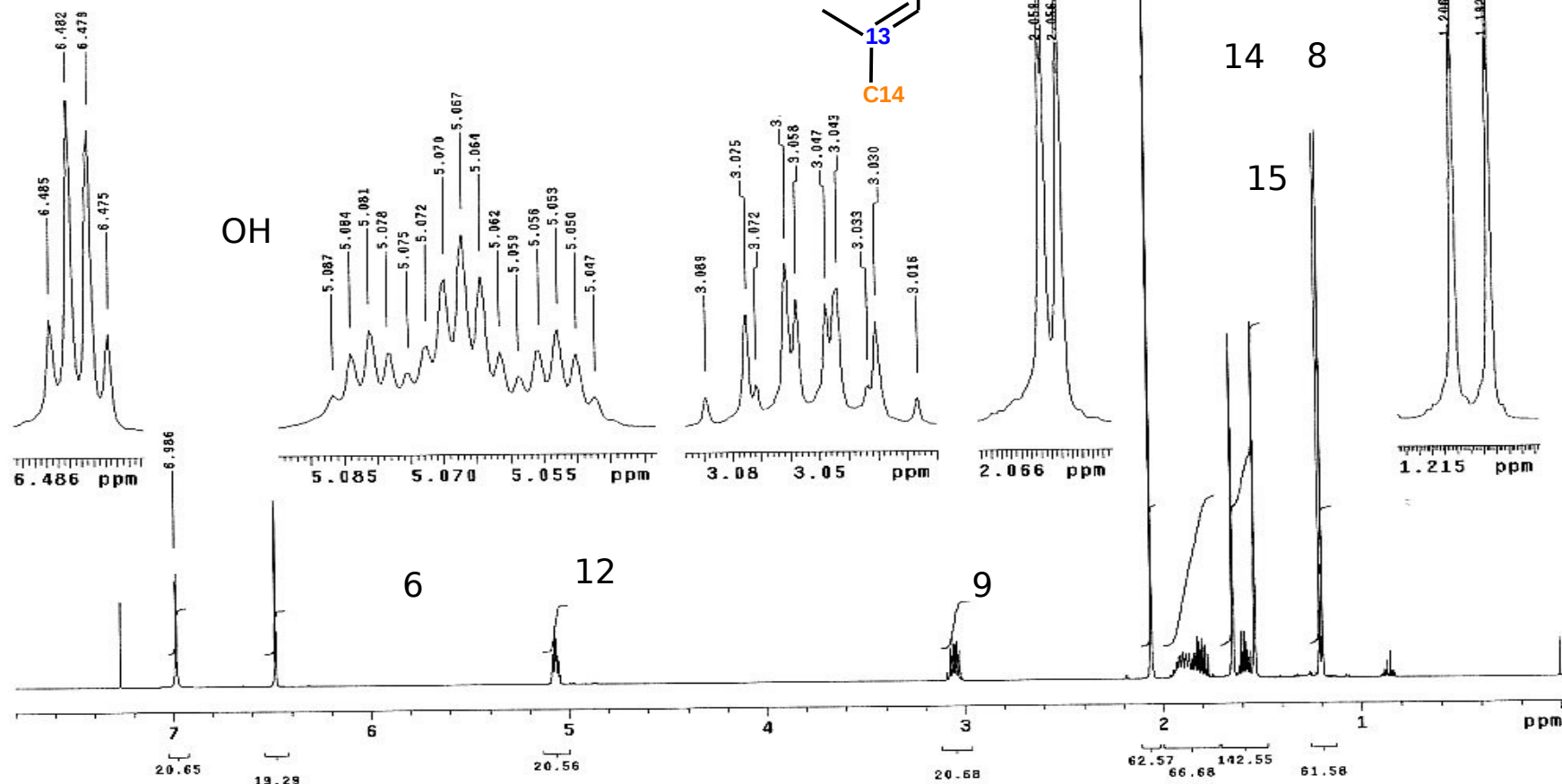
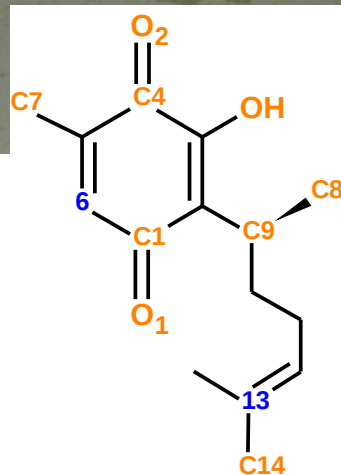


Kögl y Boer

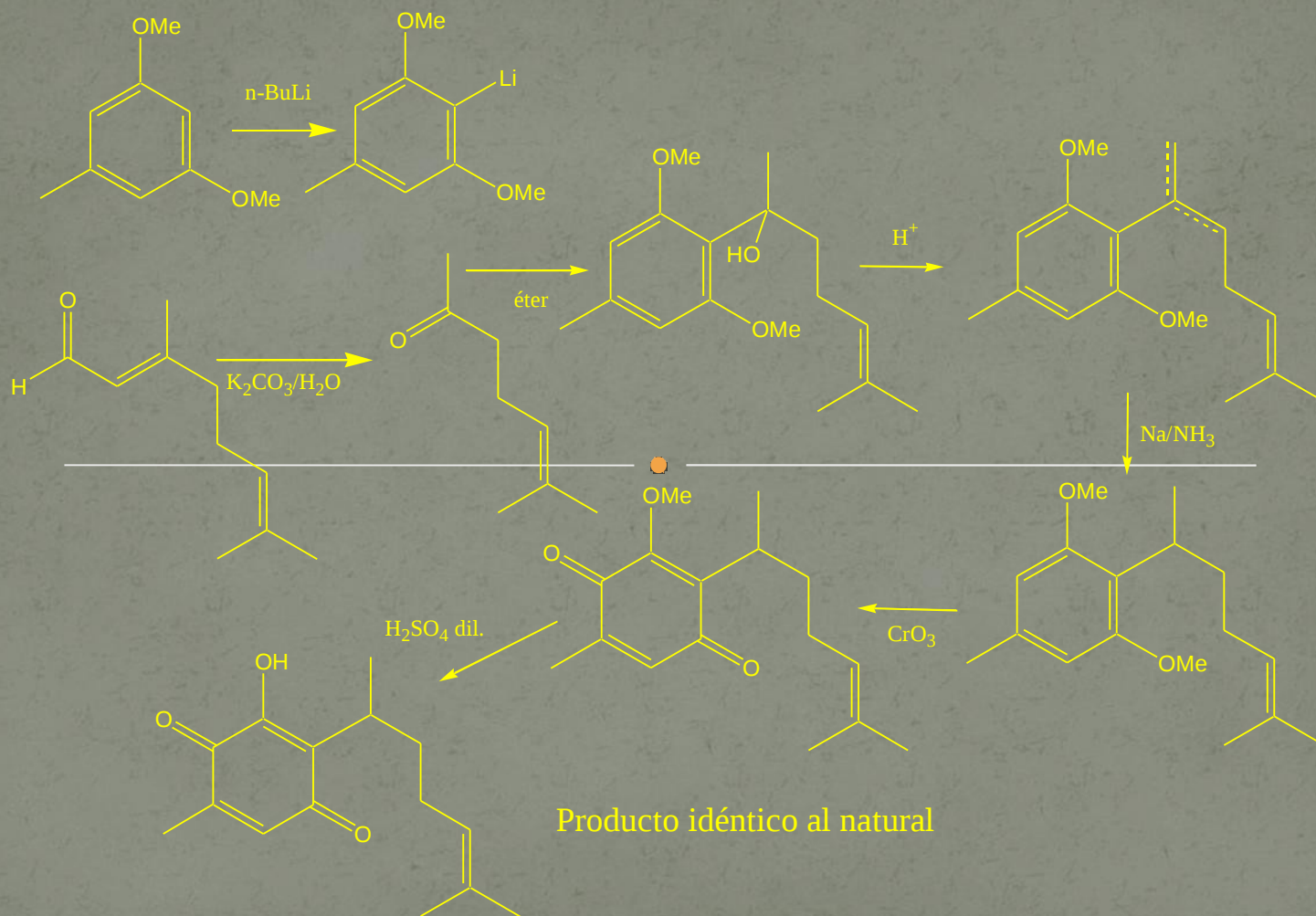
Walls *et al.*

Instituto de Química UNAM (BQG)
 Dr. G. Cuevas / G. Rousa
 Clave: PZ-CD
 No. Registro : 959
 Disolvente: CDCl₃
 Experimento: H1
 Varian-Inova 500 MHz (G)
 28-Marzo-2006

Pulse Sequence: s2pu1



Síntesis de la perezona



Quinonas

Respiración

Fotosíntesis

**Transferencia
Electrónica**
Conservación de la
Energía

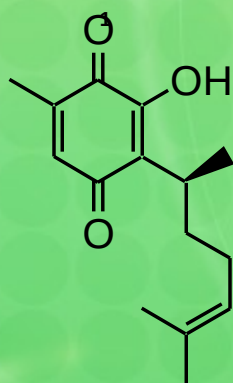
• L. Stryer, *Biochemistry*, 4th ed., Stanford University, **1995**, Capítulo 21, 26

• F. L. Crane, *Annu. Rev. Biochem.* **1977**, 46, 439.

• R. Bentley, I. M. Campbell, en *The Chemistry of Quinoid Compounds* (Ed.: S. Patai), John Wiley & Sons, London, **1974**, 683

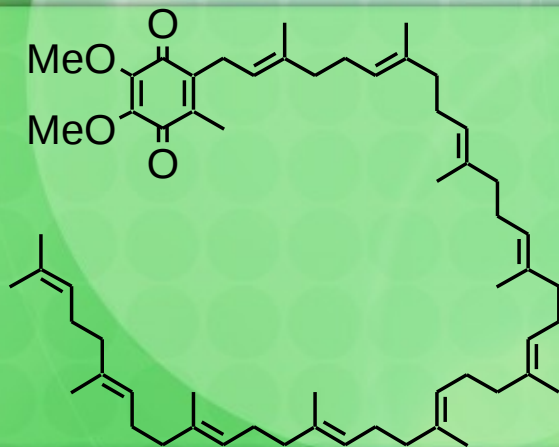
Debido a que las propiedades fisicoquímicas de las moléculas depende de los arreglos que adquieren sus átomos en el espacio, es fundamental entender cuales son los principios que controlan estas preferencias conformacionales.

perezona



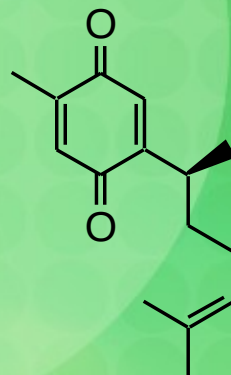
1

ubiquinona (Qn)



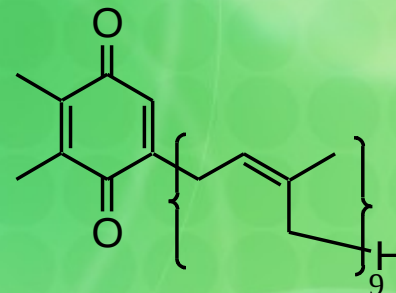
2

curcuquinona



3

poliprenil quinona



4

Antecedentes

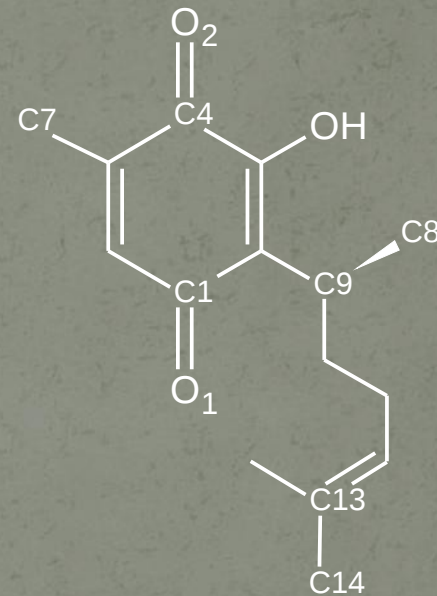
- ✓ ¿Tiene algún efecto la cadena?
- ✓ ¿La naturaleza tiene una razón para generar moléculas con estas cadenas?
- ✓ ...el enlace doble $C=C$ del isopropilideno parece distante.

Yu et al. :

- ✓ La flexibilidad en la cadena alifática adyacente al grupo benzoquinona en los derivados de Q, es un requerimiento para la transferencia electrónica.
- ✓ La reducción de la actividad electrónica, así como el reconocimiento molecular depende de:
 - ✓ de la longitud de la cadena
 - ✓ la conjugación en la cadena alifática.

También se propone:

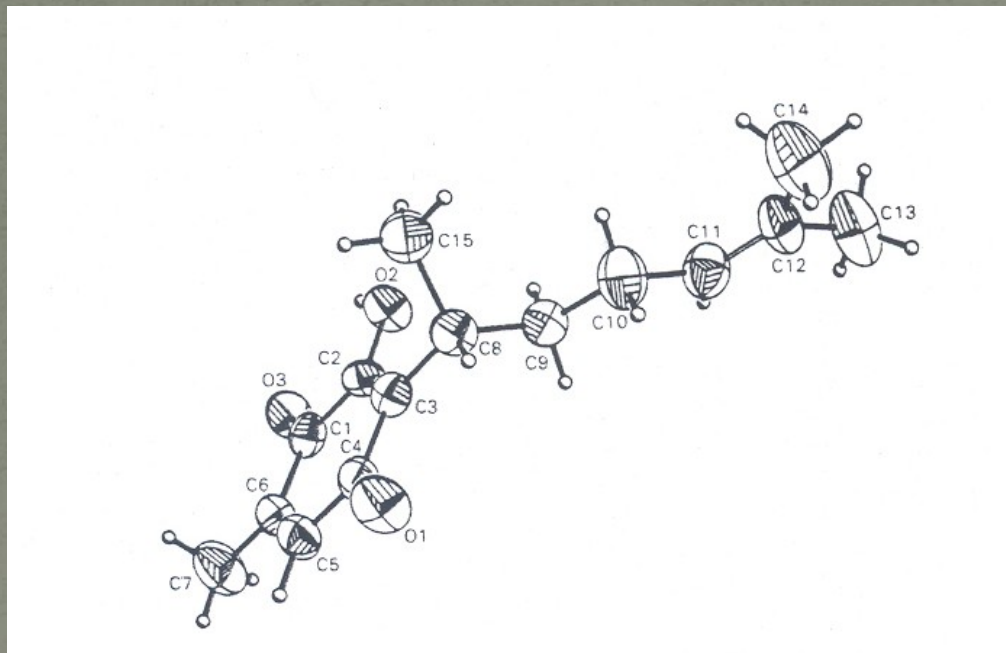
- ✓ Es la cadena ramificada, que contiene un grupo metilo y una unidad isopreno (que incluye al doble enlace C-C), la responsable de la afinidad de Q al sitio de unión de la proteína que la reconoce.



- ✓ No es claro que sólo la flexibilidad y longitud de la cadena sea la responsable del comportamiento observado.

☑ ¿Qué se sabe de la conformación de la perezona?

¿Es posible que un doble enlace localizado en posición remota respecto al anillo de la quinona tenga influencia en las propiedades electroquímicas de la molécula?



Fin del problema de la conectividad

Conformación de la perezona en estado sólido.

“La conformación en solución es idéntica a la del estado sólido”

Cómo obtener la perezona

✓ perezona (*Perezia cuernavacana*)



Foto A. Sandoval, 1964.
Infrutescencia de *Perezia Cuernavacana* mostrando el vilano de sus flores.

Cómo obtener la perezona

- ✓ perezona (*Perezia cuernavacana*)
 - ☑ Extracción: maceración c/hexano
 - ☑ Separación: filtración y concentración
 - ☑ Purificación: columna flash



Foto A. Sandoval, 1964.
Infrutescencia de *Perezia Cuernavacana* mostrando el vilano de sus flores.

• M. Aguilar-Martínez, J. A. Bautista-Martínez, N. Macías-Ruvalcaba, I. González, E. Tovar, T. Marín del Alizal, O. Collera, G. Cuevas, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 8349

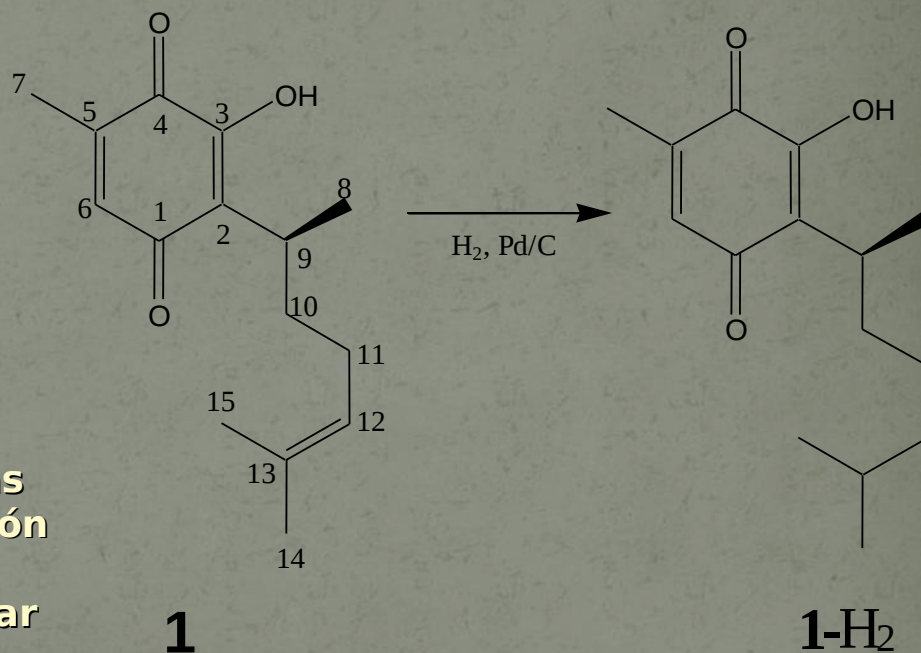
Cómo obtener la dihidroperezona

Hidrogenación de la perezona



... curioso por su aspecto, precioso por las reacciones que presenta y útil por la acción que ejerce sobre el organismo. A este principio, que tengo el honor de presentar con la cristalización que le es propia, he dado el nombre de ácido pipitzahoico ...

¡Primer producto natural aislado en América!

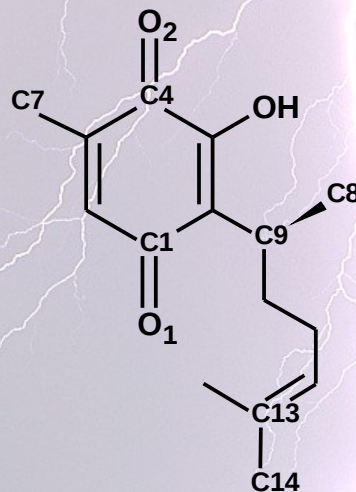


- Kögl, F.; Boer, A.G.; *Rec. Trav. Chim.* **1935**, 54, 779.
- D. A. Archer, R. H. Thomson, *J. Chem. Soc. (C)* **1967**, 1710
- M. Aguilar-Martínez, G. Cuevas, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 8349

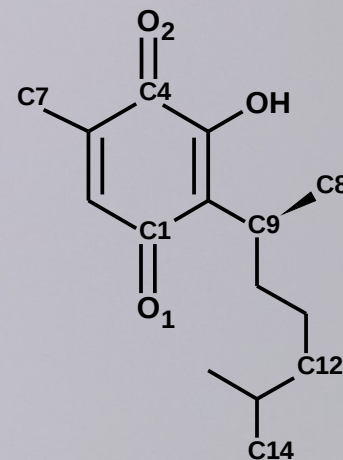
Voltamperometría Cíclica

- ✓ 1.0 mM de perezona
Et₄NBF₄ / acetonitrilo
Electrodo C vítreo
Barrido de potencial 0.1 V/s

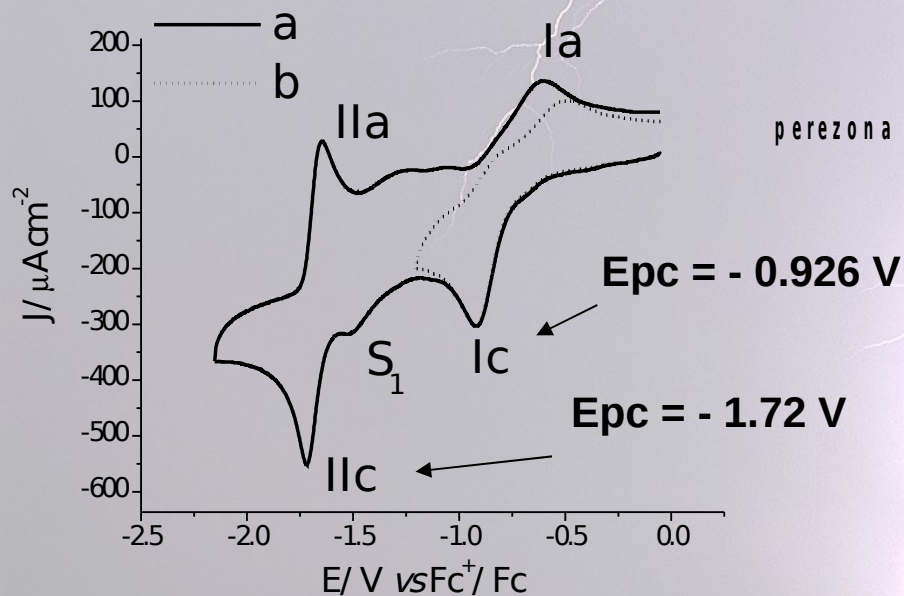
ES MÁS DÍFICIL REDUCIR ELECTROQUÍMICAMENTE A LA PEREZONA



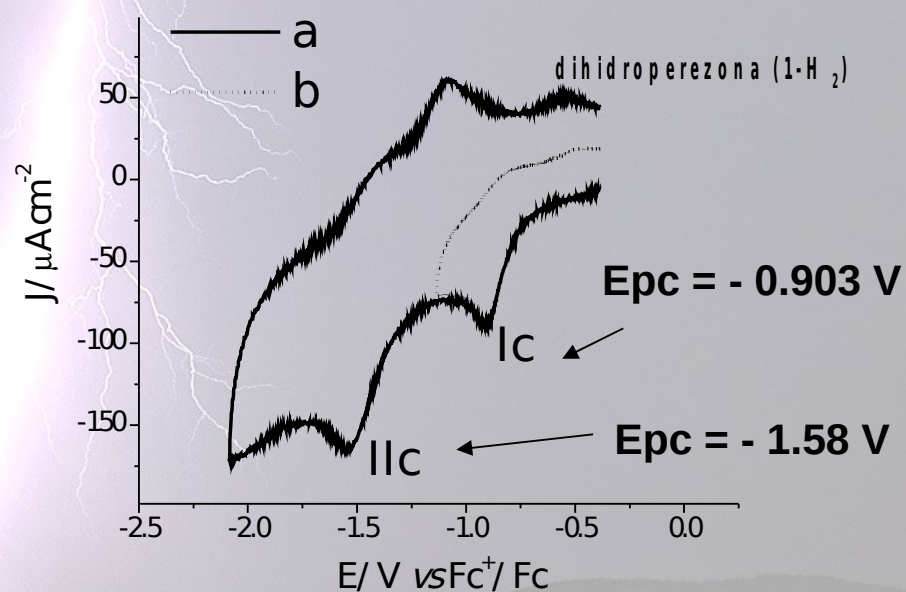
perezona (1)



dihidroperezona (1·H₂)



mayor corriente de respuesta



menor corriente de respuesta

Antecedentes

Cambio en el ambiente electroquímico

✓ Ecuación de Randles-Sevcik

$$i_p = (2.69 \cdot 10^5) n^{3/2} \cdot A \cdot D \cdot v^{1/2} \cdot c$$

i_p = corriente de pico (mA/cm²)

n = número de electrones transferidos

A = área transversal electrodo (cm²)

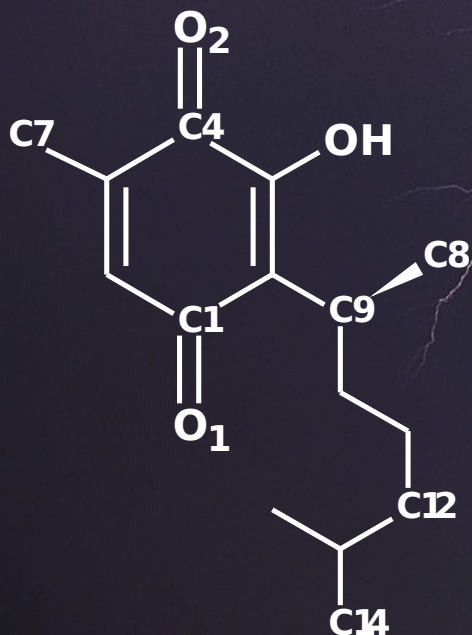
D = coeficiente de difusión (cm²/s)

v = velocidad de barrido (volt/s)

c = concentración (moles/cm³)

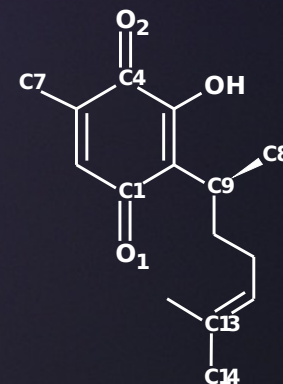
Antecedentes

Cambio en el ambiente electroquímico



✓ Ecuación de Randles-Sevcik

$$i_p = \frac{(2.69 \cdot 10^5) n^{3/2} \cdot A \cdot D \cdot \nu^{1/2}}{C}$$



perezona (1)

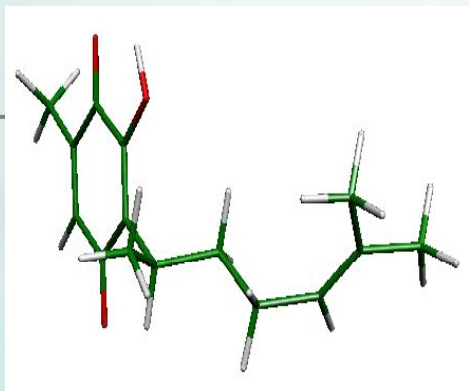
dihidroperezona (1-H 2)

Metodología

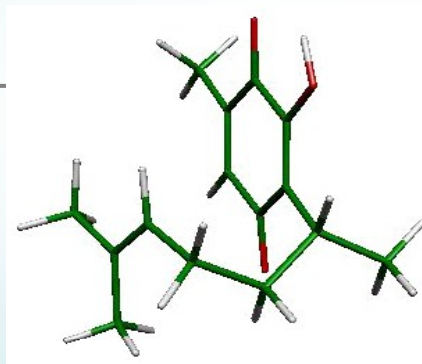
- ✓ Cálculos computacionales
- ✓ Optimización de la geometría:
 - ✓ MP2, B3LYP con la base 6-31G(*d,p*)
 - ✓ Single Point: MP2 con la base 6-31+
+G(*d,p*)

- Gaussian 03, Revision C.02, Frisch, M.J. *et.al.*; Gaussian, Inc. Wallingford CT, **2004**
- Gaussian 94, Revision E.2, Frisch, M.J. *et.al.*; Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, **1995**
- F. W. Beigler-König, R. F. W. Bader, T. H. Tang, *J. Comput. Chem.* **1982**, 3, 317

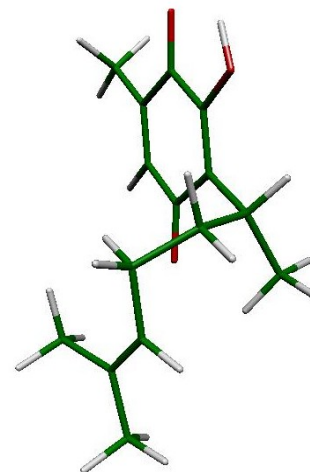
Resultados computacionales



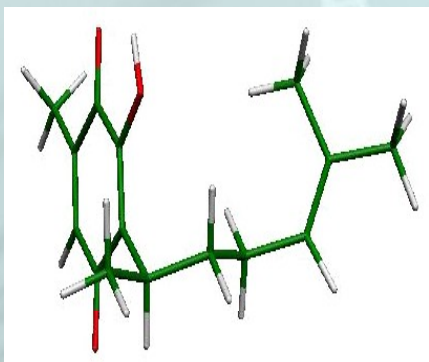
1a



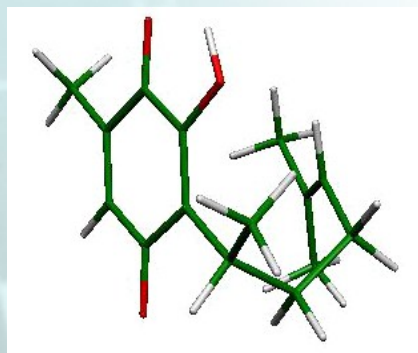
1c



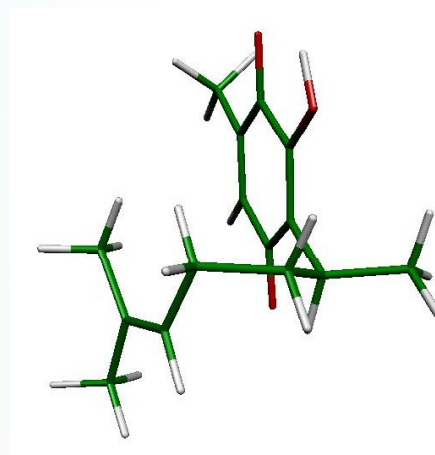
1e



1b



1d



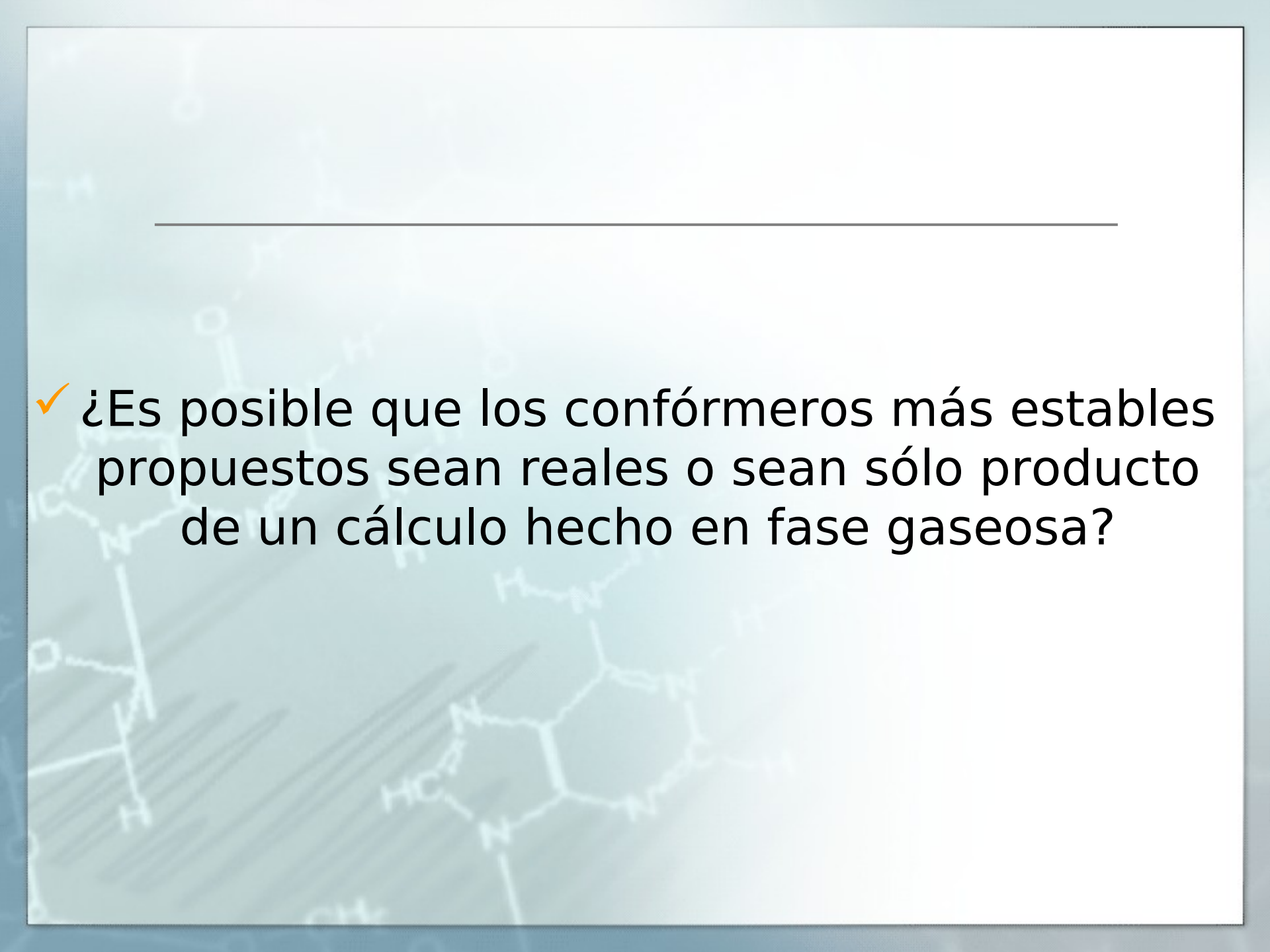
1f

• *Molekel, Versión 4.3.win32*, Date: 11.Nov.02, by Stefan Portman, Copyright © **2002** CSCS/ETHZ. (orig. IRIX GL implementation, concept and data structure by Peter F. Fluekiger, CSCS/UNI Geneva)

RMN

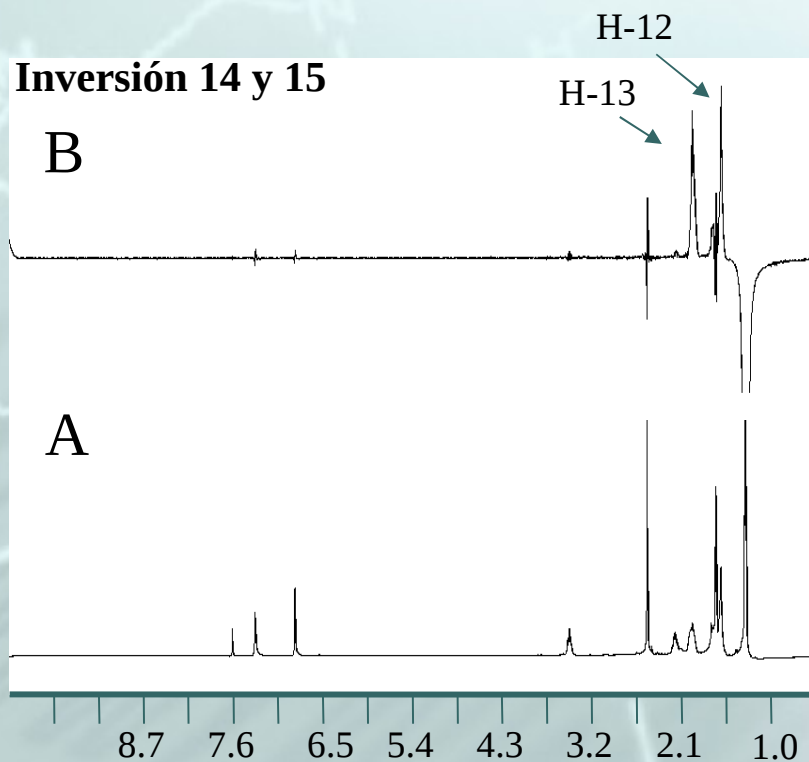
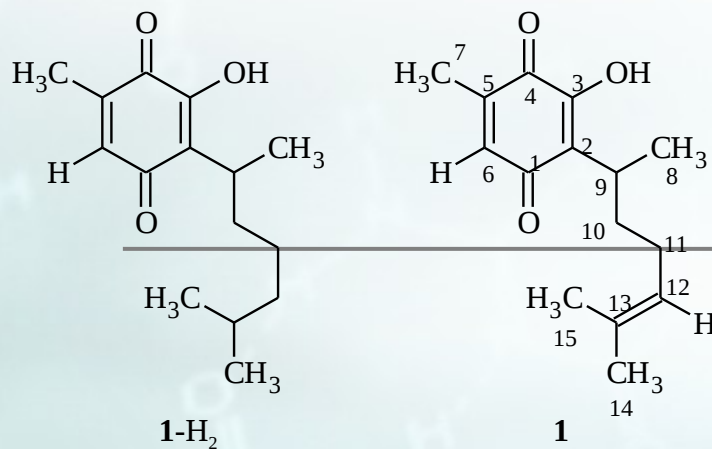
ESTUDIO CONFORMACIONAL DE LA PEREZONA



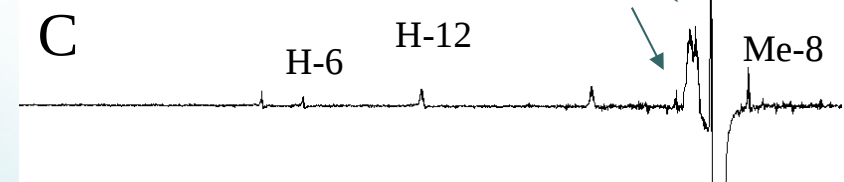
- 
- The background of the slide features faint, light blue chemical structures, including what appears to be a nucleotide base and a carboxylic acid chain, providing a scientific context for the text.
-
- ✓ ¿Es posible que los confórmeros más estables propuestos sean reales o sean sólo producto de un cálculo hecho en fase gaseosa?

RMN

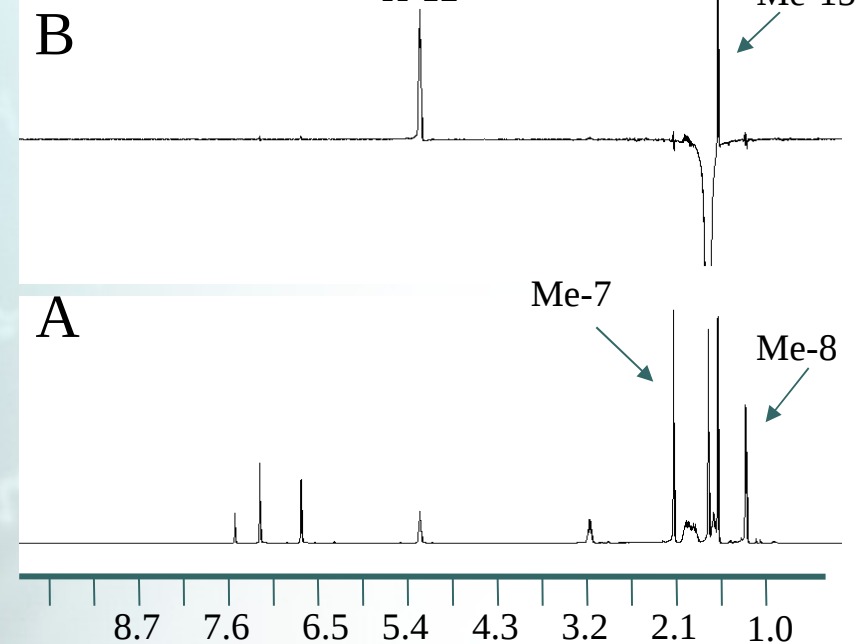
nOe



Inversión 15



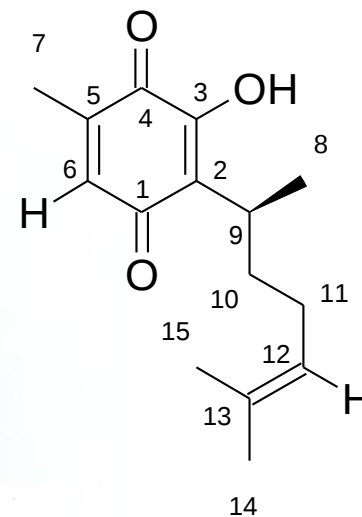
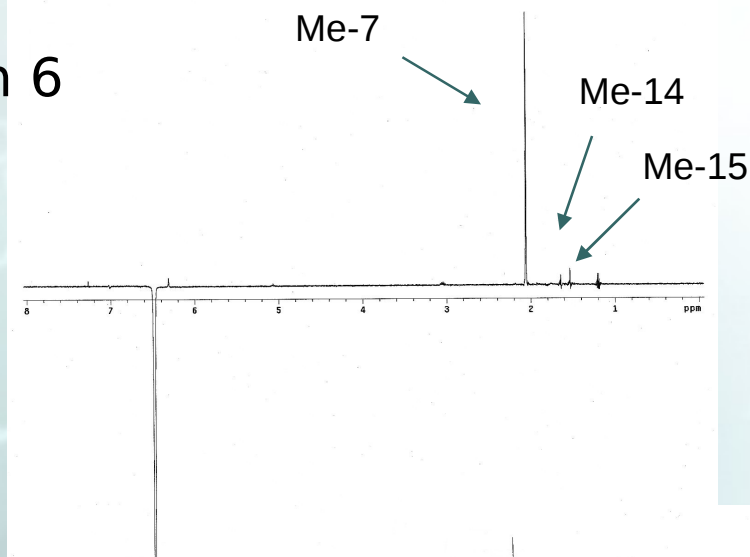
Inversión 14



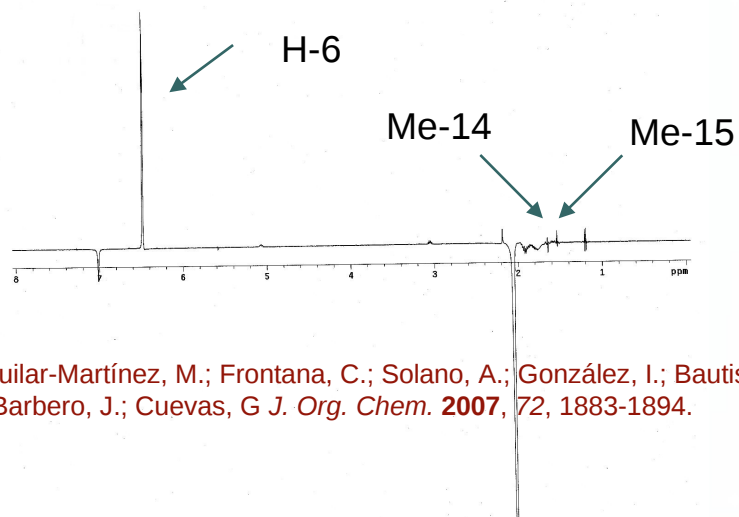
RMN

nOe

Inversion 6

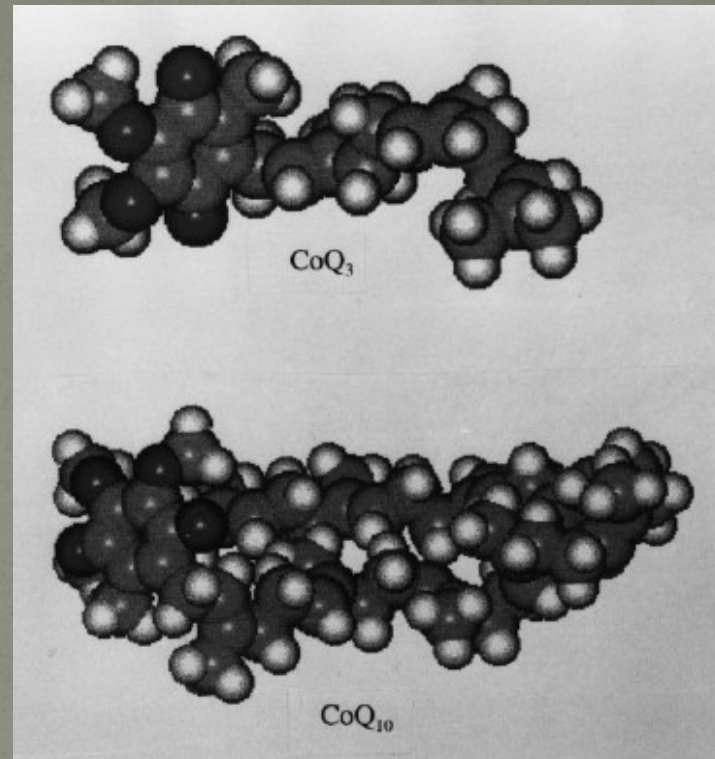


Inversion 7



Roura-Pérez, G.; Quiróz, B.; Aguilar-Martínez, M.; Frontana, C.; Solano, A.; González, I.; Bautista-Martínez, J.A.; Jiménez-Barbero, J.; Cuevas, G *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 1883-1894.

☑ Considerando el Coeficiente de Difusión



	CoQ ₁	CoQ ₂	CoQ ₃	CoQ ₁₀ folded
V_0 (Å ³)	109.30 ^a	150.72 ^a	213.52 ^a	351.70 ^a
E^b	27.2	30.5	37.9	56.1
D ($\times 10^{-6}$ cm ² /s)	3.30	2.20	1.40	1.43

^aFrom structures obtained by MD simulations.

^bPotential energy expressed in kcal/mol.

**Constitución
n
1856**

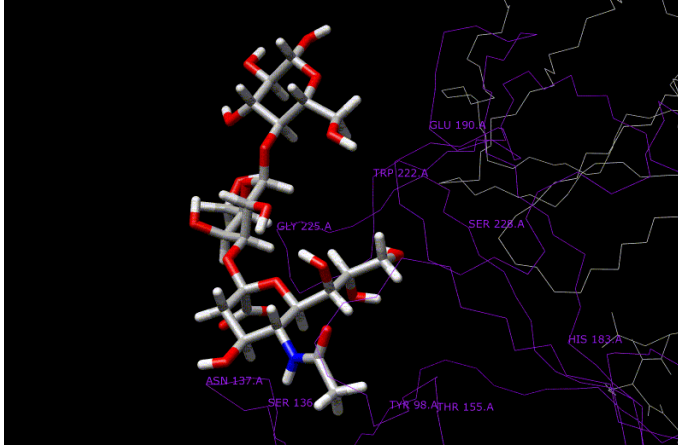
Conectividad

Configuración

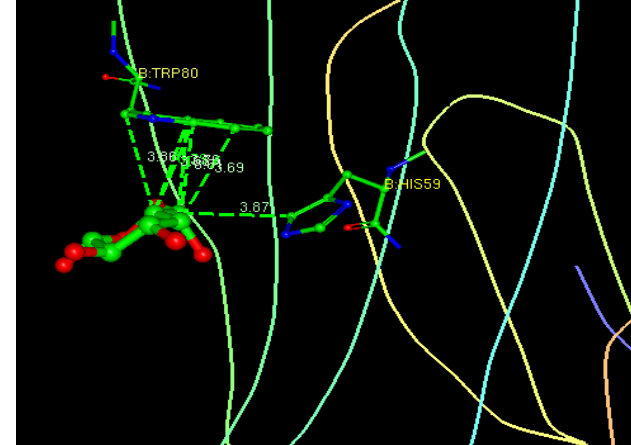
**Conformación
¿es relevante? SI
¿tiene consecuencias?
SI
2010
154 años después.**

Interacción CH/ π que media el reconocimiento entre carbohidratos y benceno es de naturaleza entálpica.

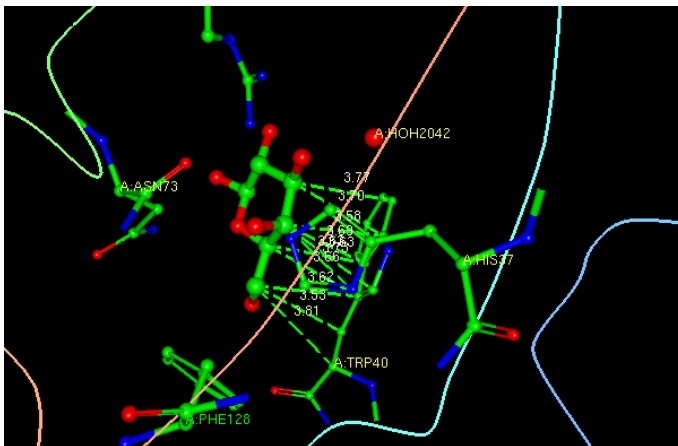
**¿Qué es la interacción
carbohidrato-proteína?**



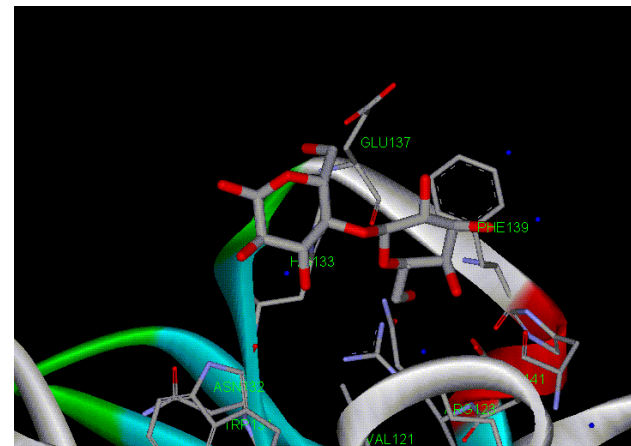
Tirosina



Triptófano

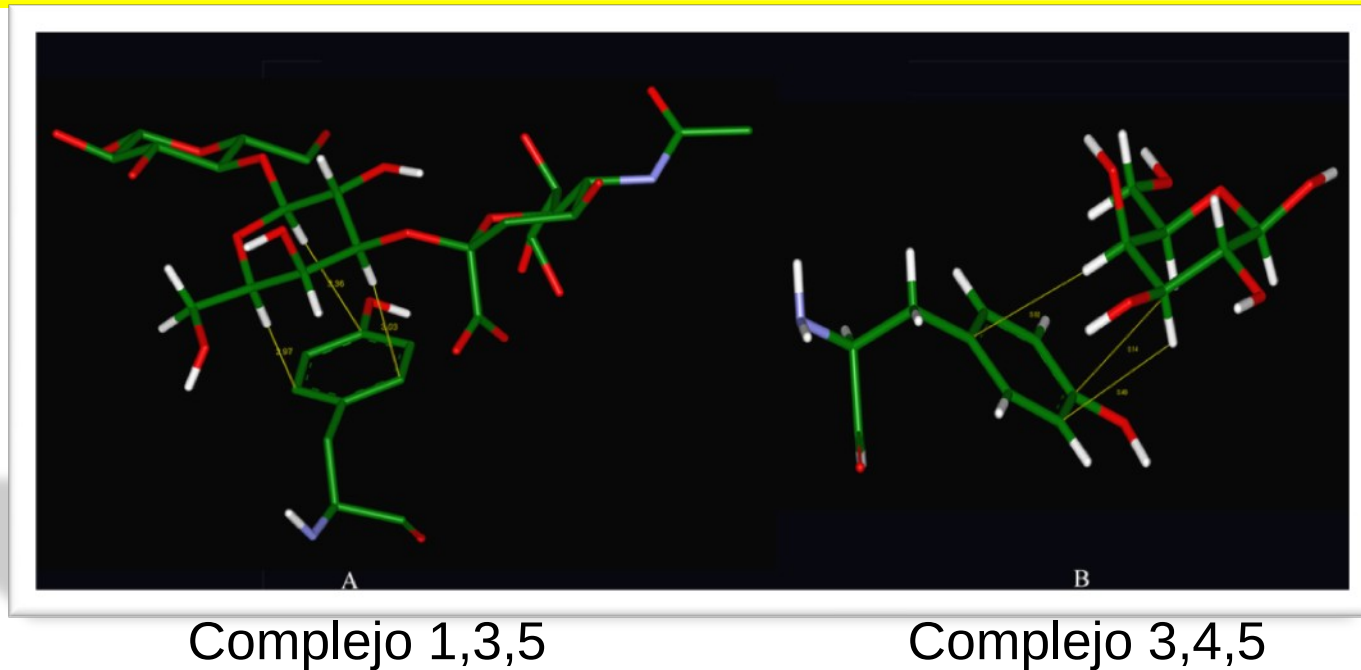


Histidina



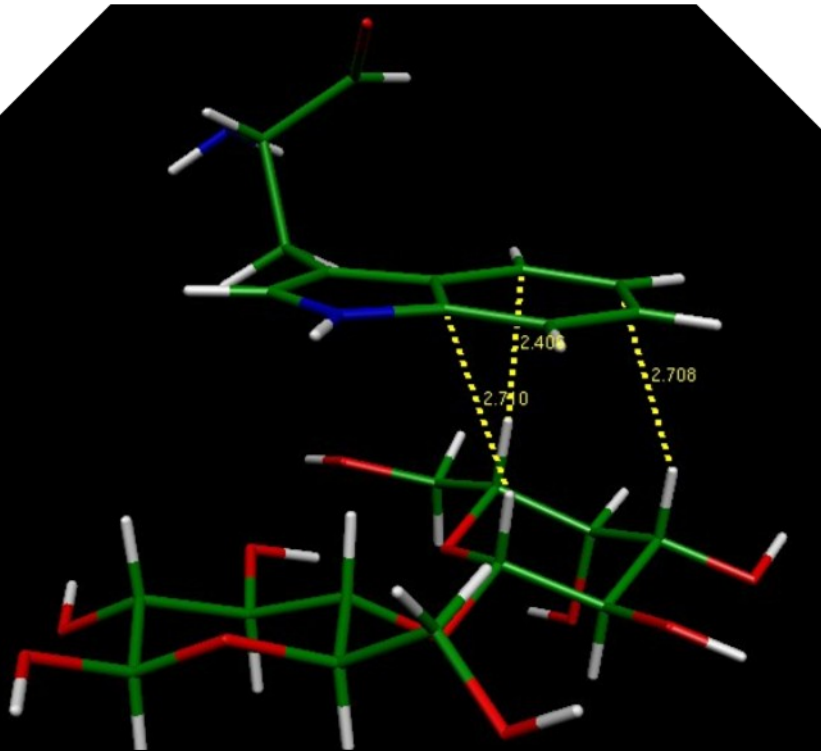
Alanina

Estructura de los sitios de Reconocimiento

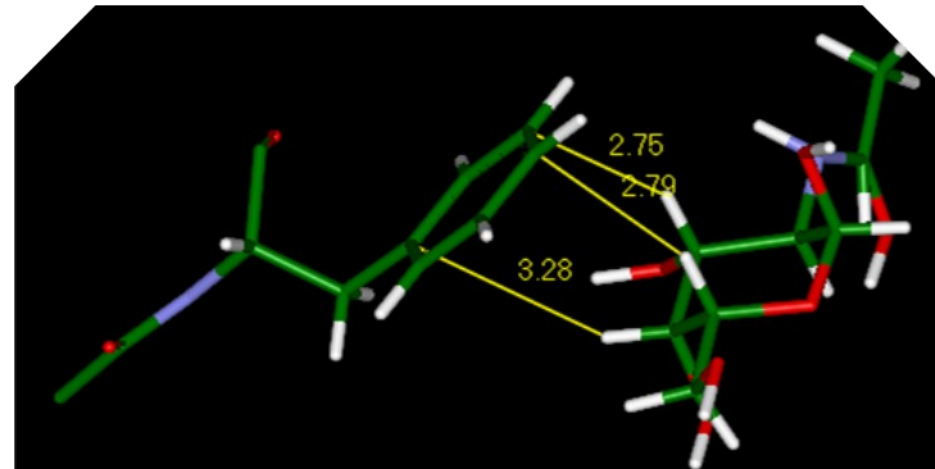


- a. Hemaglutinina del virus de la influenza acompañado con 2,3-silillactosa
- b. Lectina III de *Ulex europaeus* acompañado con galactosa.

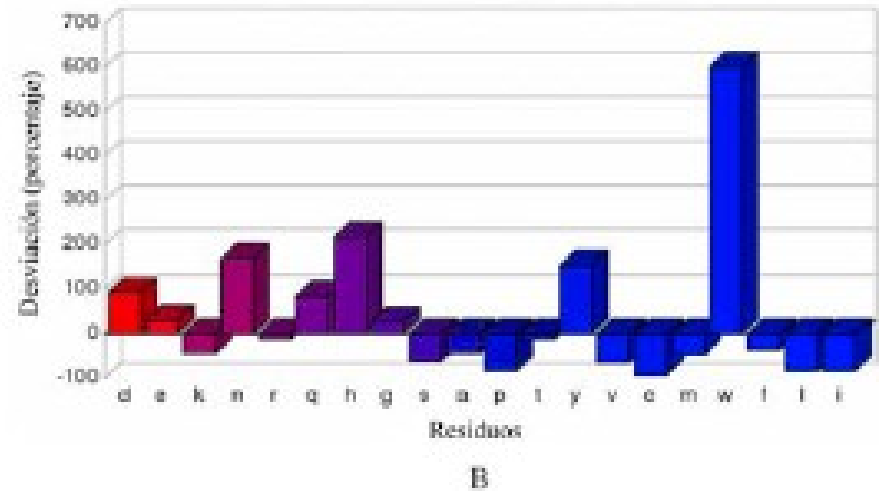
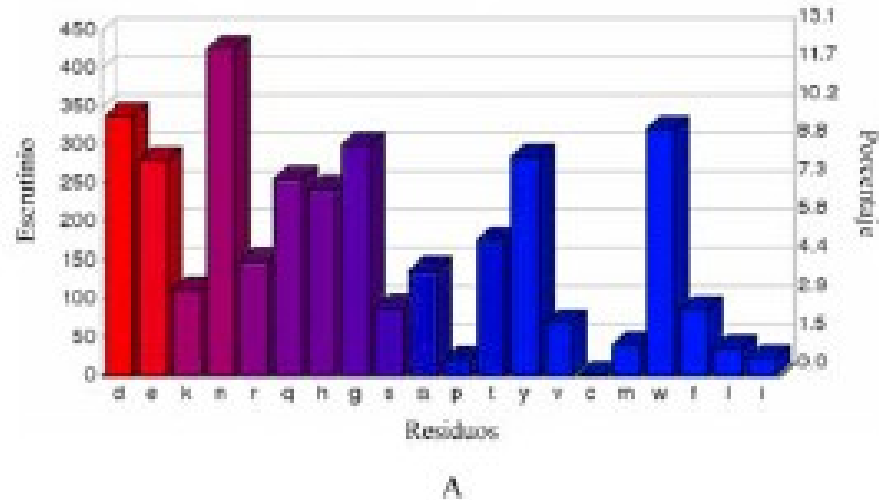
Interacciones CH- π :



*Toxina del Tetanos complejada con
lactosa*
(Resolución 1.80)



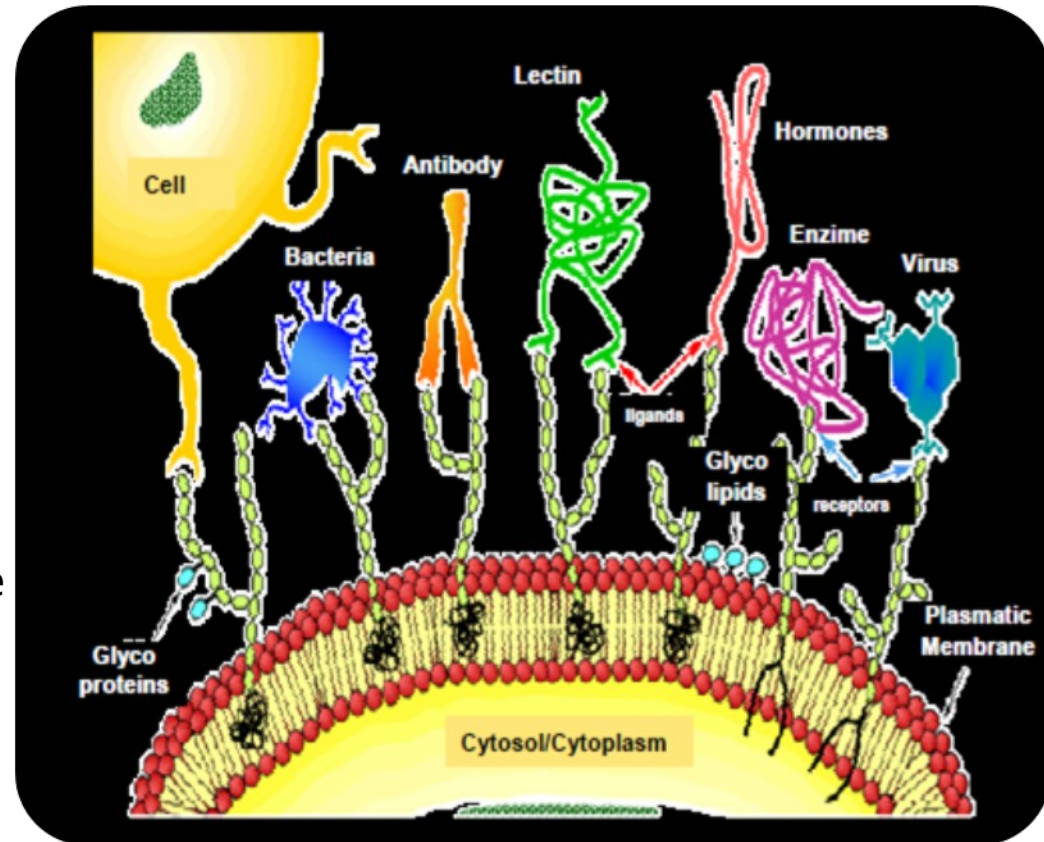
*Lectina Erythrina Corallodendron
complejada con
N-acetilgalactosamina*



a. Representación de los aminoácidos que se sitúan cerca de los residuos de Metil- β -D-Galactopiranosido. b. Desviación de la media para los residuos en cercanía espacial. Los residuos se representan en función de su polaridad (rojo Polar, azul no polar). W: triptófano, Y: tirosina, H: histidina.

Interacción proteína-carbohidrato

- Respuesta alérgica
- Embriogénesis
- Maduración tisular
- Metástasis
- Hidratación y conformación de proteínas.



¿Cuál es su origen?

- ¿Entrópico?
- ¿Entálpico?

¿Cuál es su origen?

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

□ ¿Entrópico?

Cuando el carbohidrato entra en el sitio de reconocimiento desplaza moléculas de disolvente (agua) y la entropía aumenta. Los

aminoácidos aromáticos no producen interacciones relevantes.

□ ¿Entálpico?

Las interacciones débiles producen estabilidad los aminoácidos aromáticos participan en ellas.

Condiciones para la existencia del reconocimiento molecular:

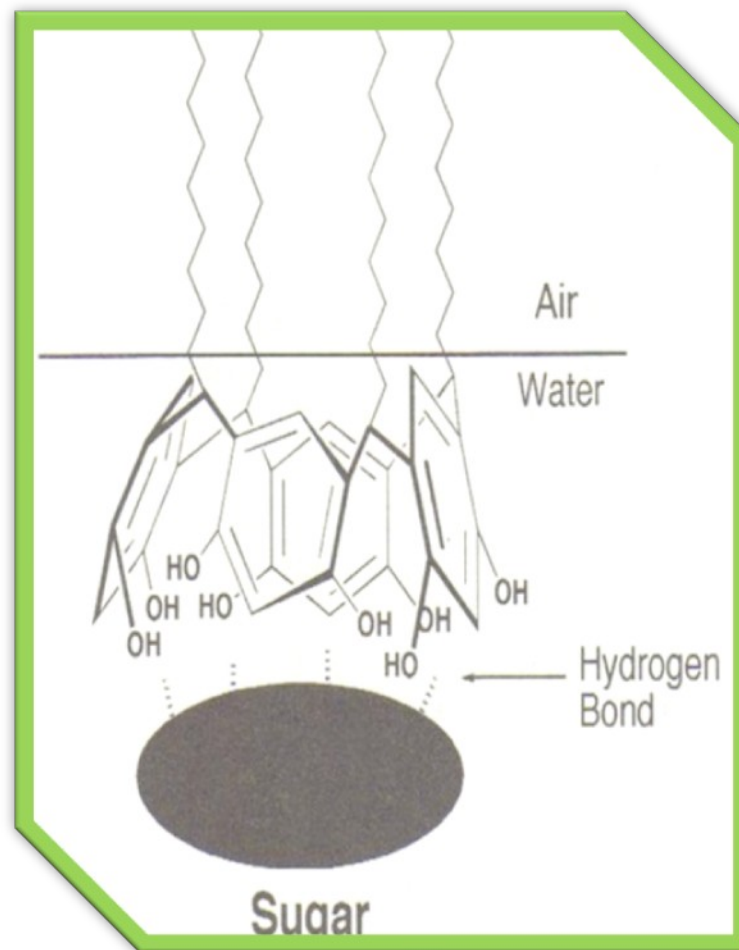
- Energía de estabilización.
- Especificidad que está asociada a:
 - Complementaridad
 - Preorganización

Reconocimiento Molecular

□ Preorganización.

Emil Fischer – 1894.
Modelo de la llave y la cerradura.

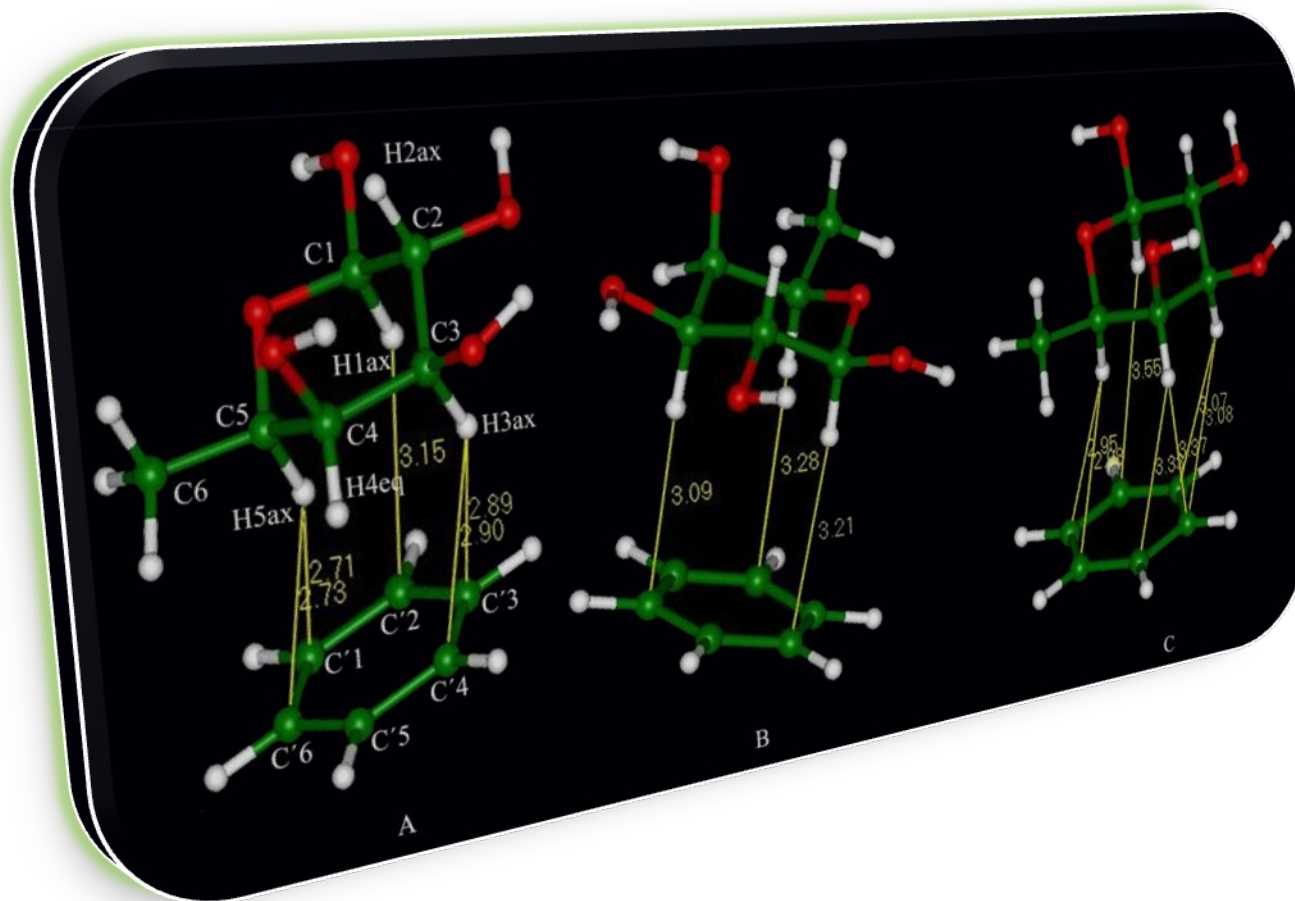
Daniel Koshland – 1958.
Modelo del ajuste inducido.



Es necesario contar con una metodología que permita evaluar estos dos aspectos.

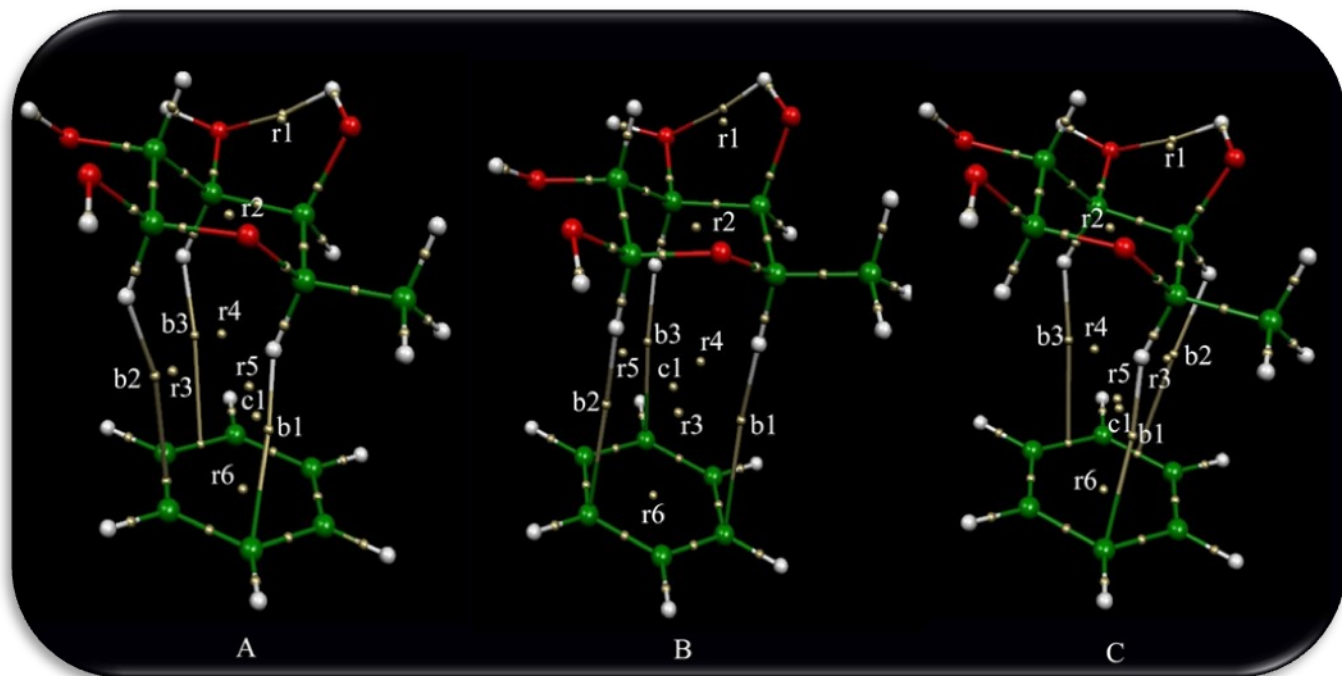
- ❖ **Energía:** métodos computacionales, calorimetría.
- ❖ **Región de interacción:** métodos computacionales, RMN.

Estados estacionarios de la supramolecula formada por benceno y fucosa.



A) MP2/6-31G(d,p); B) B3LYP/6-31G(d,p); C) MP2/6-31G(d,p) corregida por el método de contrapeso durante la optimización.

Aplicación de la Teoría Topológica de Átomos en Moléculas

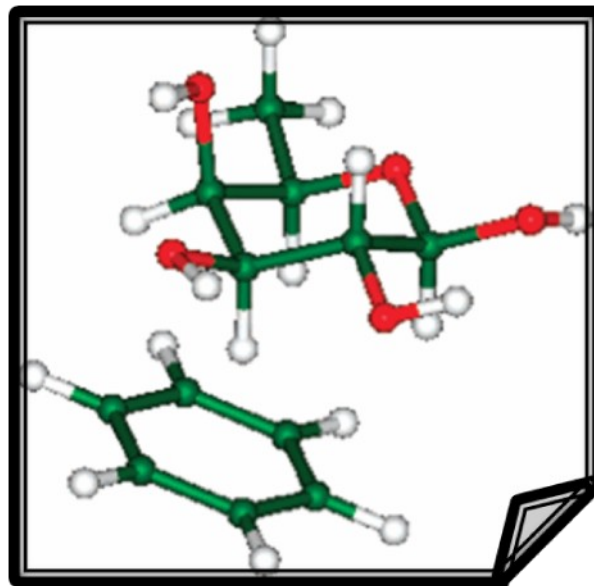


Puntos críticos en la densidad electrónica de los estados estacionarios de las supramoléculas en distintos niveles de teoría. A, MP2/6-31G(d,p); B, B3LYP/6-31G(d,p); C, MP2/6-31G(d,p) corregida por CP. De acuerdo con AIM, **b**, punto crítico de enlace; **r**, de anillo, **c**, de caja.

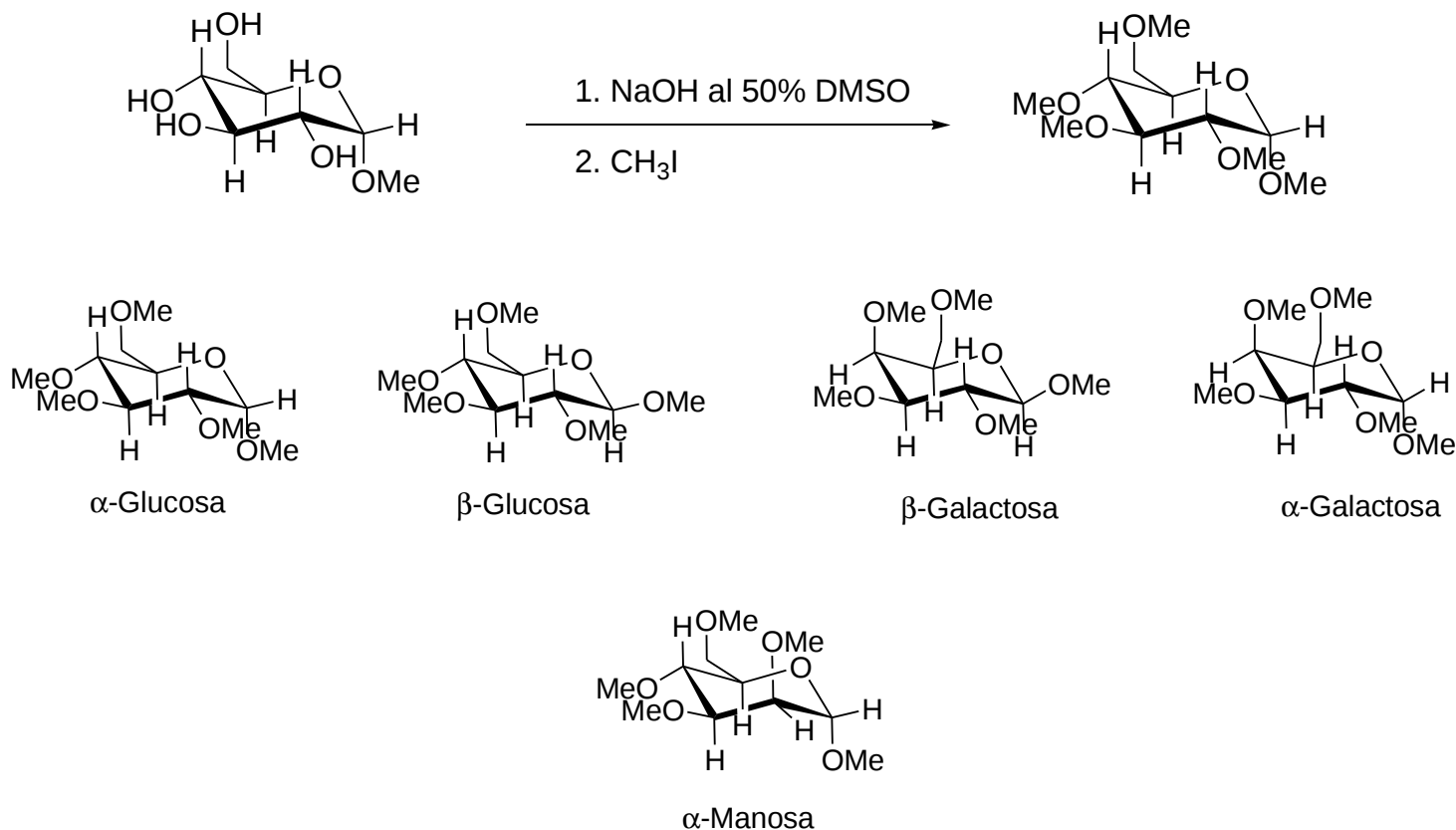
...¿Quién puede aceptar estos datos sin pruebas experimentales?

Objetivos:

- Cuantificar la energía de la interacción.
- Identificar la región donde se produce.

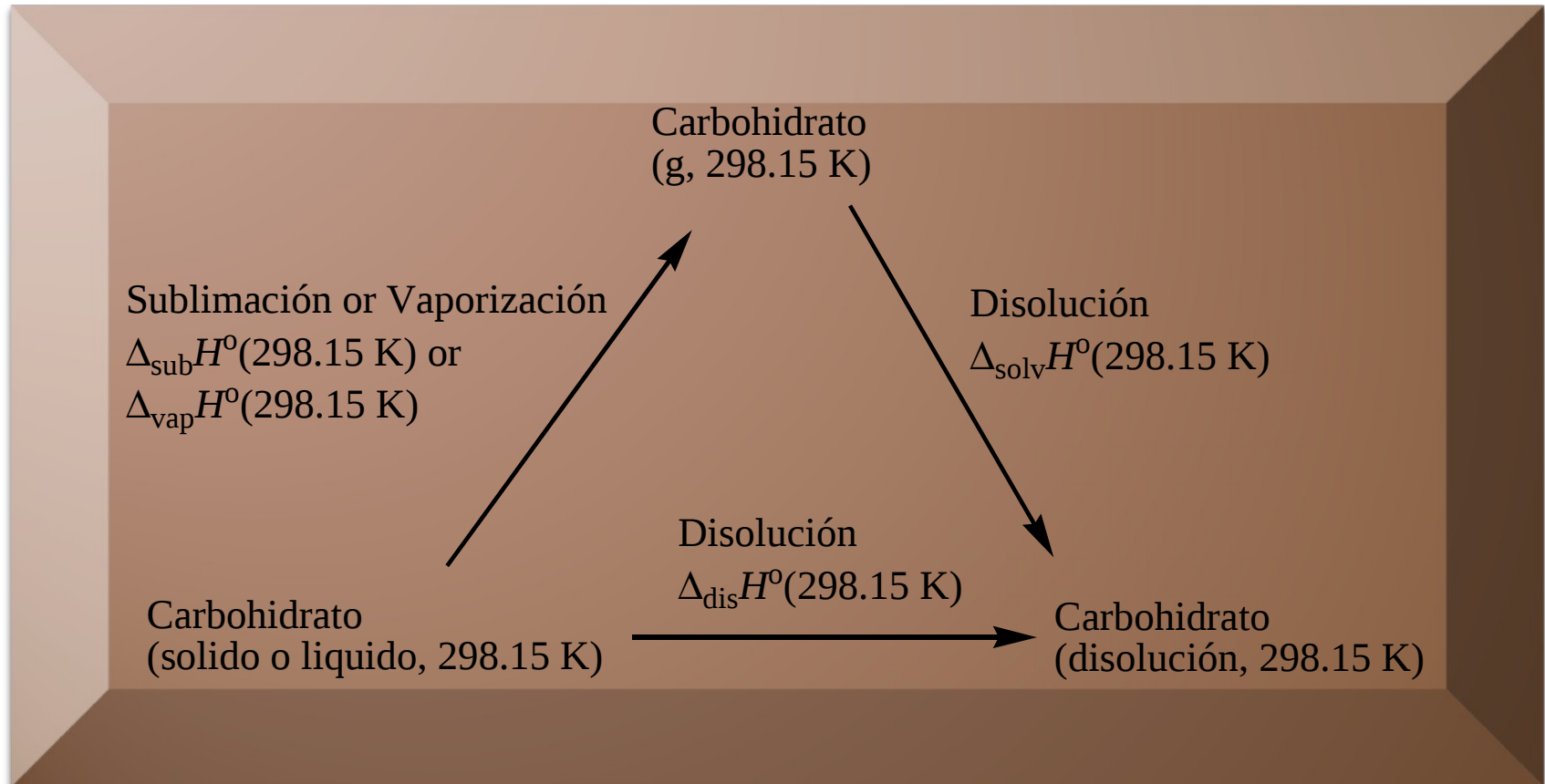


Metodología



Con pureza mayor al 99.9%

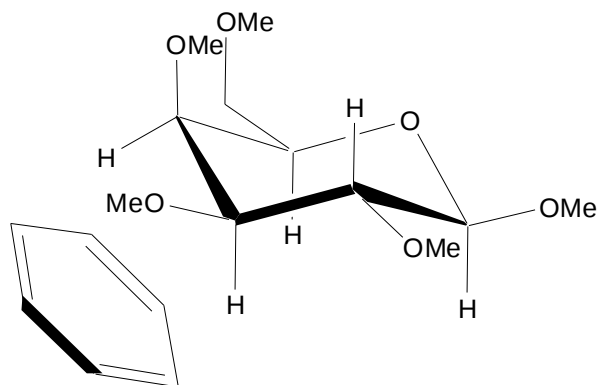
Obtención del calor de disolución.



Cuantificar la Energía de la Interacción

	$\Delta_{dis} H_m^\circ$	$\Delta_s^g H_m^\circ$ or $\Delta_l^g H_m^\circ$	$\Delta_{solv} H_m^\circ$	$\sigma_{tot}, (\pm)$
α -Me ₅ -Gal	-0.67	88.37	-89.04	2.00
β -Me ₅ -Gal	16.54	105.245	-88.71	5.54
β -Ac ₅ -Gal	12.1	144.64	-132.54	6.19
α -Me ₅ -Man	-3.65	75.177	-78.83	3.91

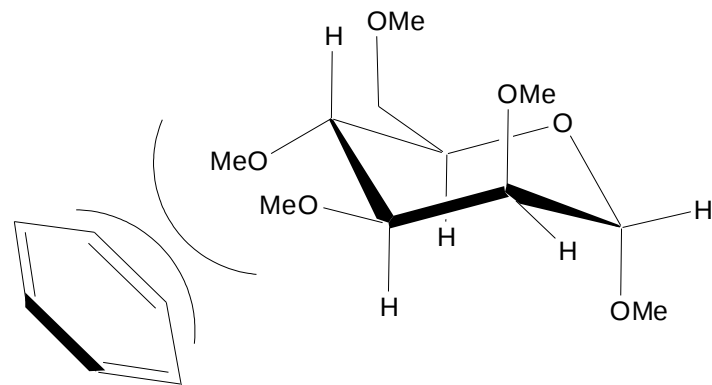
$$\text{CH}/\pi \text{ energy} = \Delta_{solv} H_{m(1)}^\circ - \Delta_{solv} H_{m(2)}^\circ$$



CH/ π attractive environment

a

$$\Delta_{dis}^{\circ} H_m = -88.7 \pm 5.5 \text{ kJ mol}^{-1}$$



No CH/ π repulsive environment

b

$$\Delta_{dis}^{\circ} H_n = -78.8 \pm 3.9 \text{ kJ mol}^{-1}$$

CH/ π interaction Energy = 9.9 kJ mol^{-1}

Evaluación de la Energía CH/ π (kJ mol⁻¹)

$$\text{Energía CH}/\pi = \Delta_{\text{solv}} H^0_m (1) - \Delta_{\text{solv}} H^0_m (2)$$

1-metoxi-4-metilbenceno	13.6
o-xileno	13.8
m-xileno	13.4
p-xileno	13.7
1,2-dimetoxibenceno	13.2
1,3-dimetoxibenceno	12.8
Benceno	9.9

Valor MP2/6-31G(d,p) 12.5 kJ mol⁻¹ Fernández-Alonso, M.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J.; Cuevas, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 7379.

Lorena Bautista-Ibáñez, Karla Ramírez-Gualito, Beatriz Quiroz-García, Aarón Rojas-Aguilar, Gabriel Cuevas *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 849.

Entalpías de solvatación en kJ mol⁻¹ de Metil 2,3,4,6-tetra-O-metil- α -D-manopiranosido (**1**) y Metil 2,3,4,6-tetra-O-metil- β -D-galactopiranosido (**2**) en diferentes disolventes aromáticos (1:10 mol:mol).

Determinadas por Microcalorimetría Calvet Microcalorimetry a 303.15 K. El valor para **1** es constante: 75.177 kJ mol⁻¹ y es 105.245 para **2**.

Disolvente	α -manosa permetilada			β -galactosa permetilada		
	$\Delta_{dis} H_m^\circ$	$\Delta_{solv} H_m^\circ$	$\sigma_{tot}, (\pm)^a$	$\Delta_{dis} H_m^\circ$	$\Delta_{solv} H_m^\circ$	$\sigma_{tot}, (\pm)$
1-metoxi-4-metilbenceno	0.938	-74.239	3.898	17.391	-87.854	5.655
o-xileno	2.623	-72.554	3.899	18.914	-86.331	5.536
m-xileno	2.996	-72.181	3.897	19.386	-85.859	5.547
p-xileno	2.625	-72.552	3.897	19.249	-85.996	5.564
1,2-dimetoxibenceno	1.055	-74.122	3.897	17.970	-87.275	5.582
1,3-dimetoxibenceno	-1.069	-76.246	3.899	16.175	-89.070	5.545
benceno	-3.649	-78.826	3.906	16.537	-88.708	5.536

¿Cómo evaluar la región molecular
en donde se produce la
interacción?

Anisotropía Inducida (B_0)

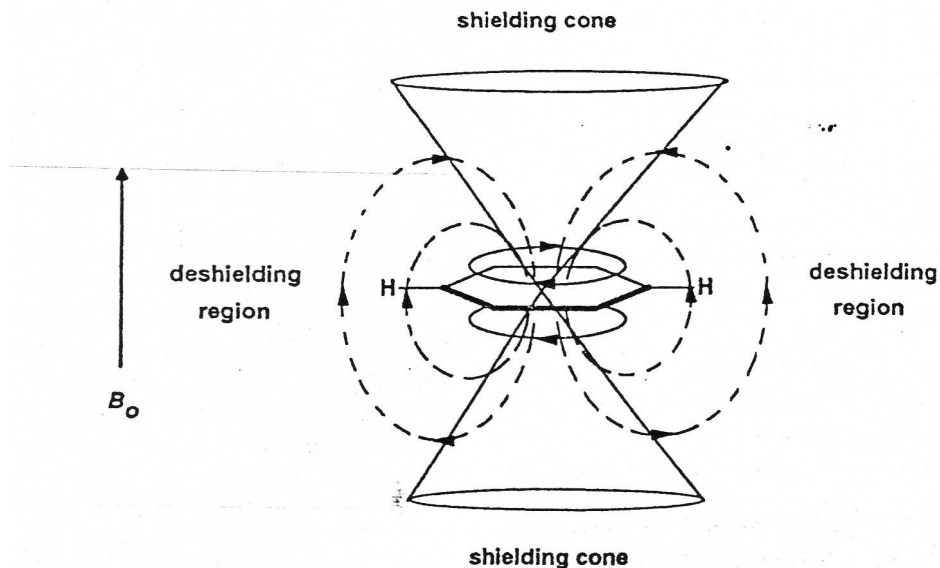
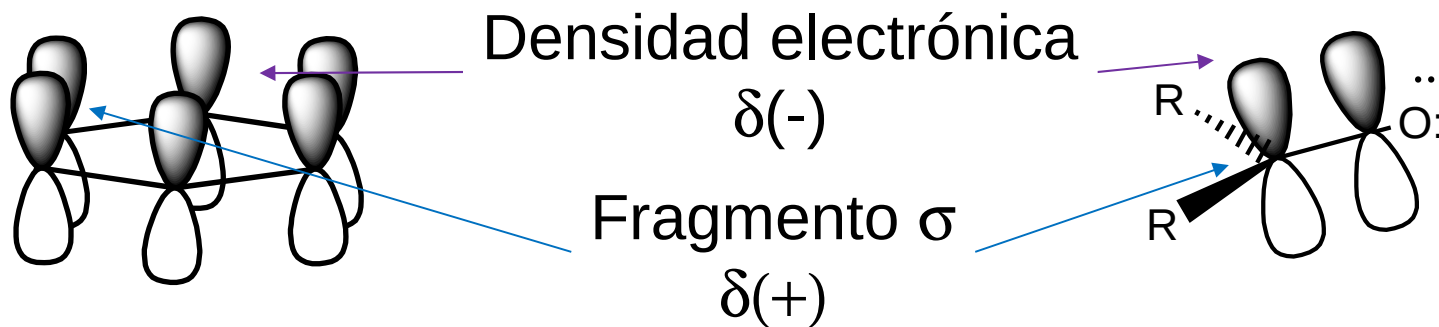
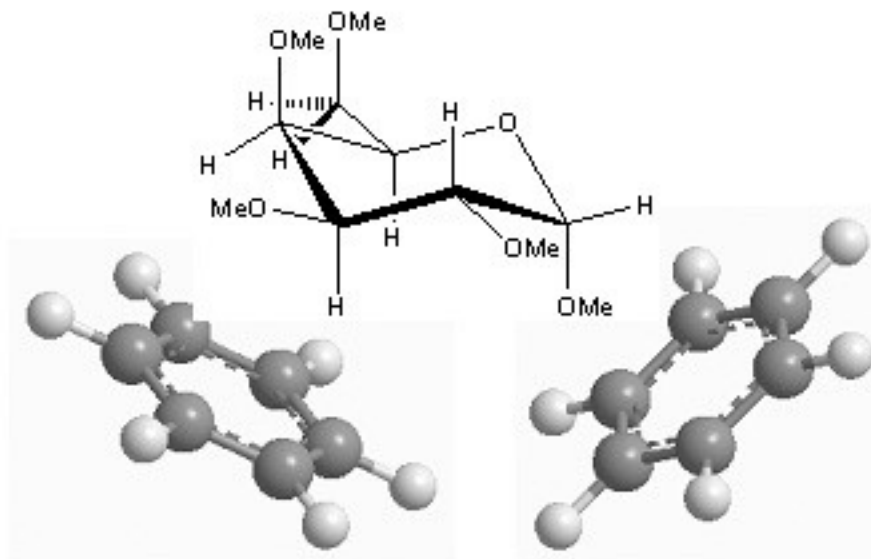
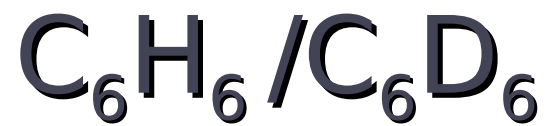
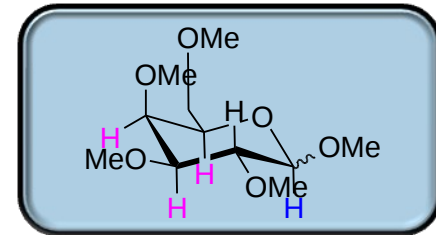


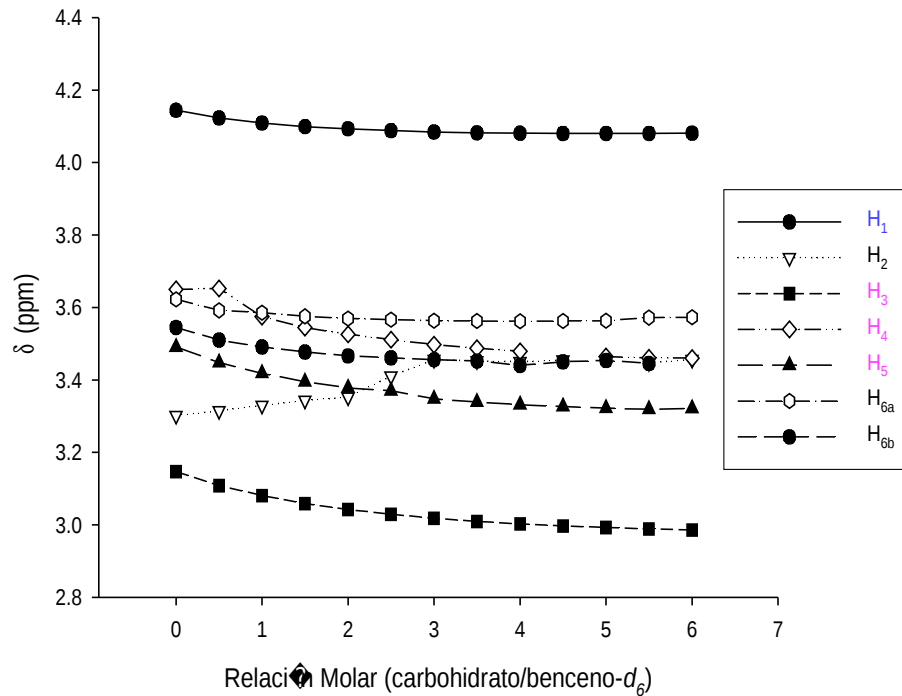
Figure 6.5. Anisotropic-induced magnetic field (dotted lines) in the proximity of an aromatic ring. The ellipses above and below the ring represent the ring current of π electrons.



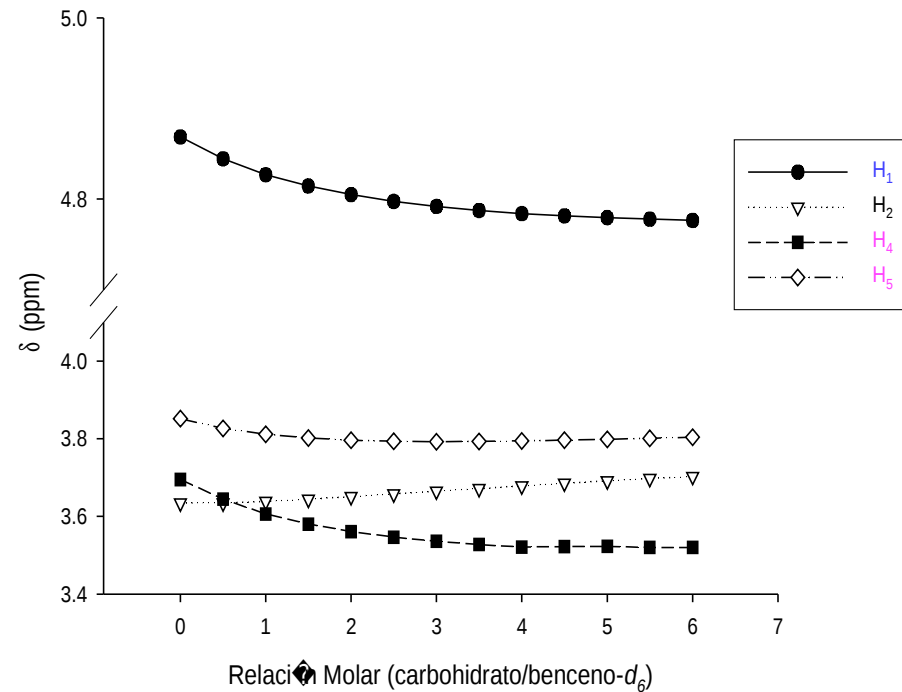
Titulaciones Anisotrópicas

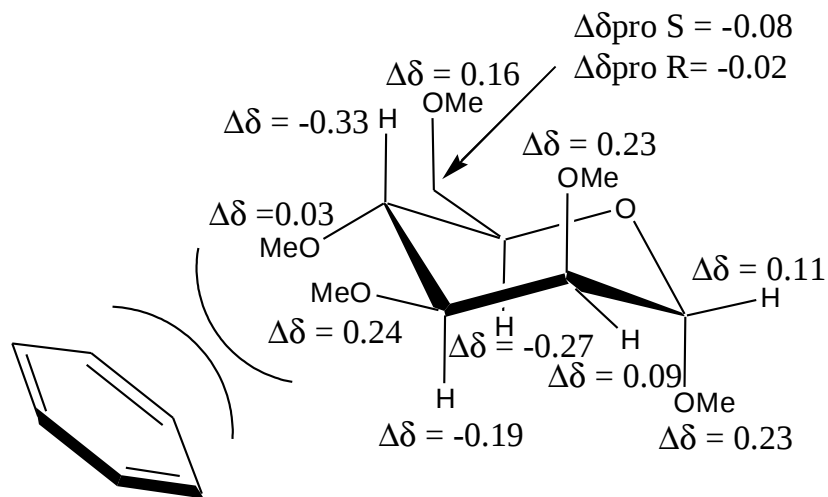
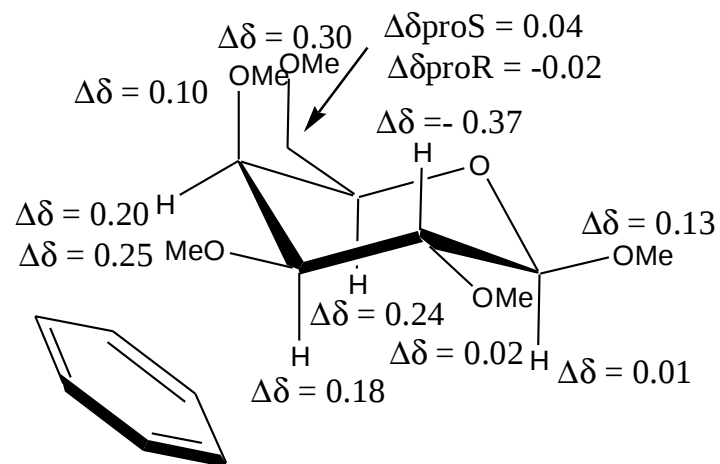


β -Galactosa

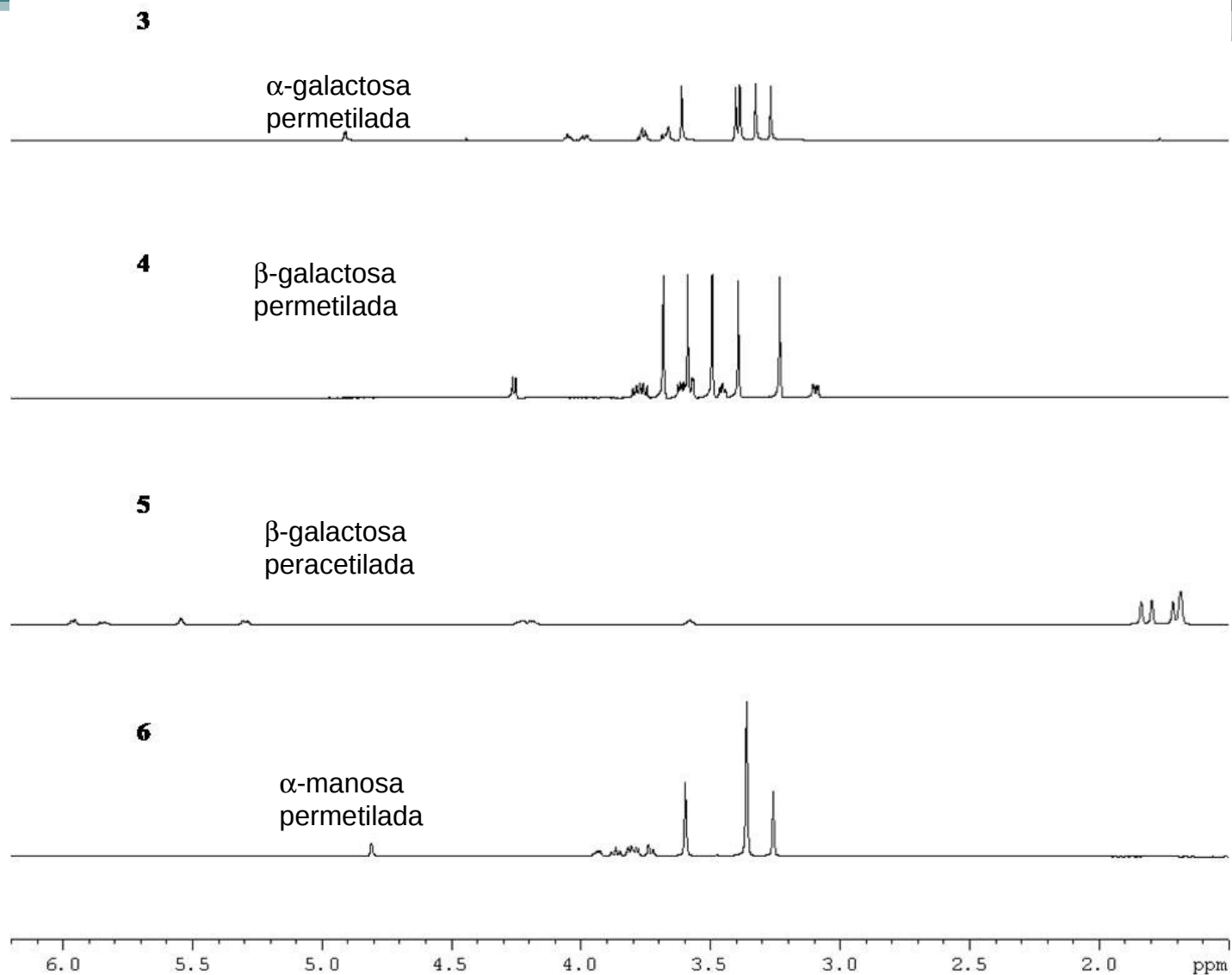


α - Galactosa



**a**No interacción CH/ π **b**CH/ π atractiva

Efecto de la interacción CH/ π en el corrimiento químico de **1** y **2** medidos a través de: $\Delta\delta = \delta_{\text{CDCl}_3} - \delta_{\text{C}_6\text{D}_6}$ en ppm.



Retomando el caso anómalo de la peracetilación:

	$\Delta_{dis} H_m^\circ$	$\Delta_s^g H_m^\circ$ or $\Delta_l^g H_m^\circ$	$\Delta_{solv} H_m^\circ$	$\sigma_{tot}, (\pm)$
α -Me ₅ -Gal	-0.67	88.37	-89.04	2.00
β -Me ₅ -Gal	16.54	105.245	-88.71	5.54
β -Ac ₅ -Gal	12.1	144.64	-132.54	6.19
α -Me ₅ -Man	-3.65	75.177	-78.83	3.91

$$\text{CH}/\pi \text{ energy} = \Delta_{solv} H_{m(1)}^\circ - \Delta_{solv} H_{m(2)}^\circ$$

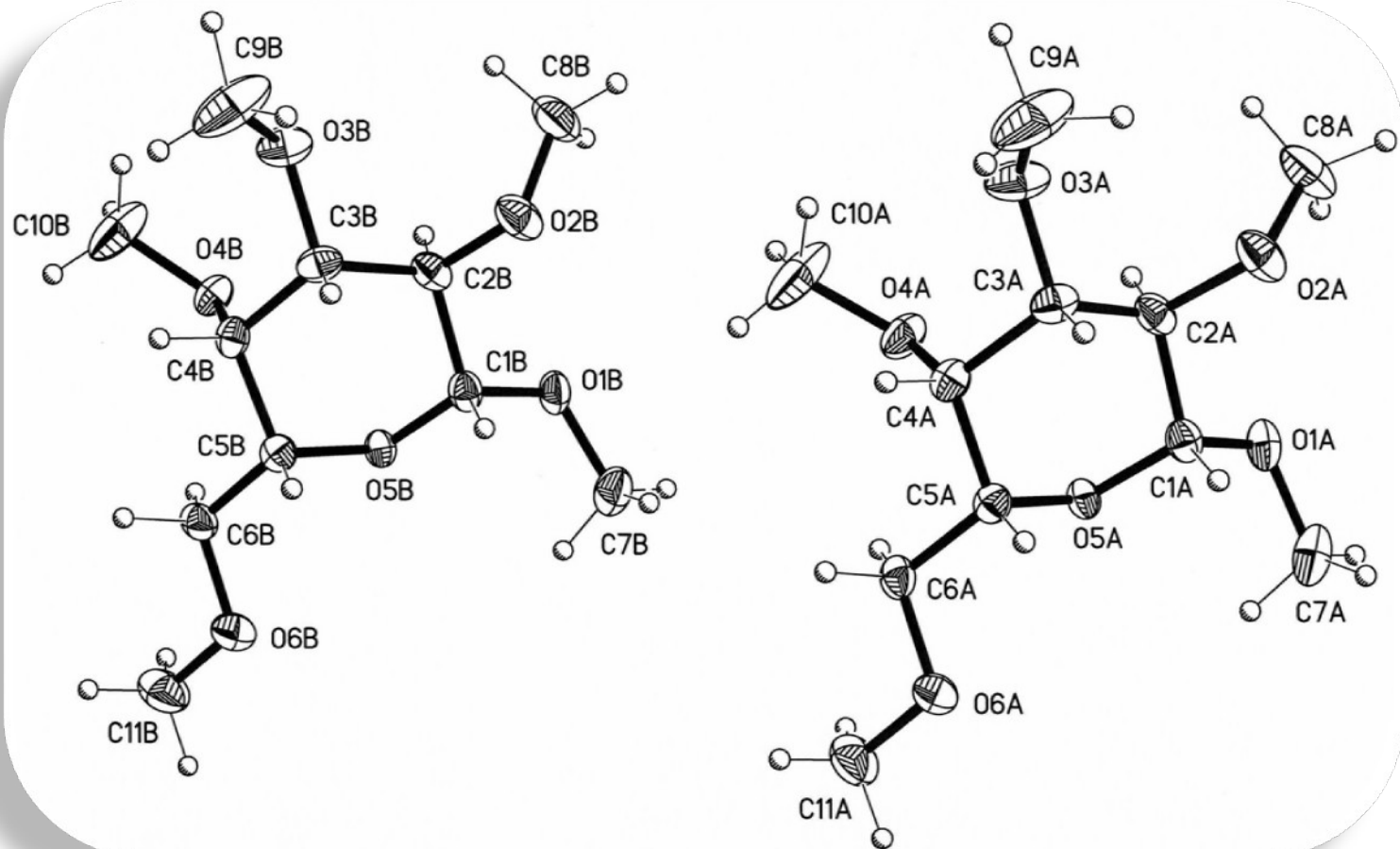
Antecedente:

- Waters et al. concluyen que los grupos metilo de acetilo y de metoxilo son idénticos en cuanto a su capacidad de interacción con el disolvente.

¿Lo son?

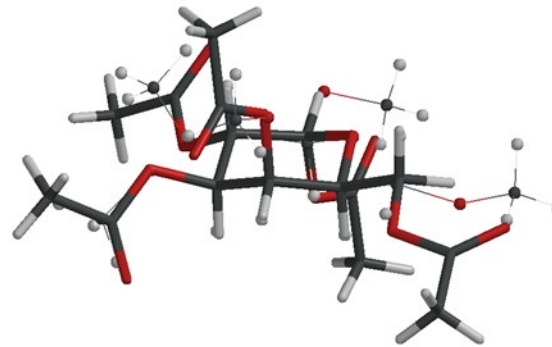
- Kiehna, S. E.; Laughrey, Z. R.; Waters, M. L. *Chem. Commun.* **2007**, 4026-4028.
- Tatko, C. D.; Waters, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2028-2034.
- Laughrey, Z. R.; Kiehna, S. E.; Riemen, A. J.; Waters, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14625-14633.

Rayos X β -galactosa permetilada

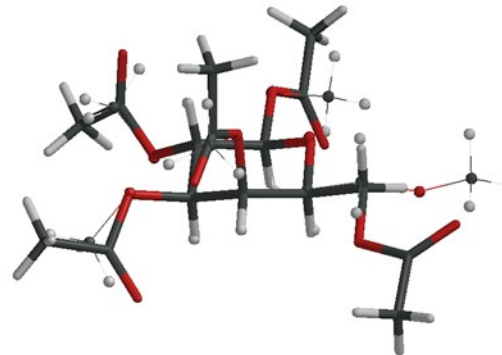


Difracción de rayos X

α -galactosa acetilada¹



β -galactosa acetilada²



1) Thibodeaux, D. P.; Johnson, G. P.; Stevens, E. D.; French, A. D. *Carbohydr. Res.* **2002**, 337,.

2) Kumar, R.; Tiwari, P.; Maulik, P. R.; Misra, A. K. *Carbohydr. Res.* **2005**, 340, 2335.

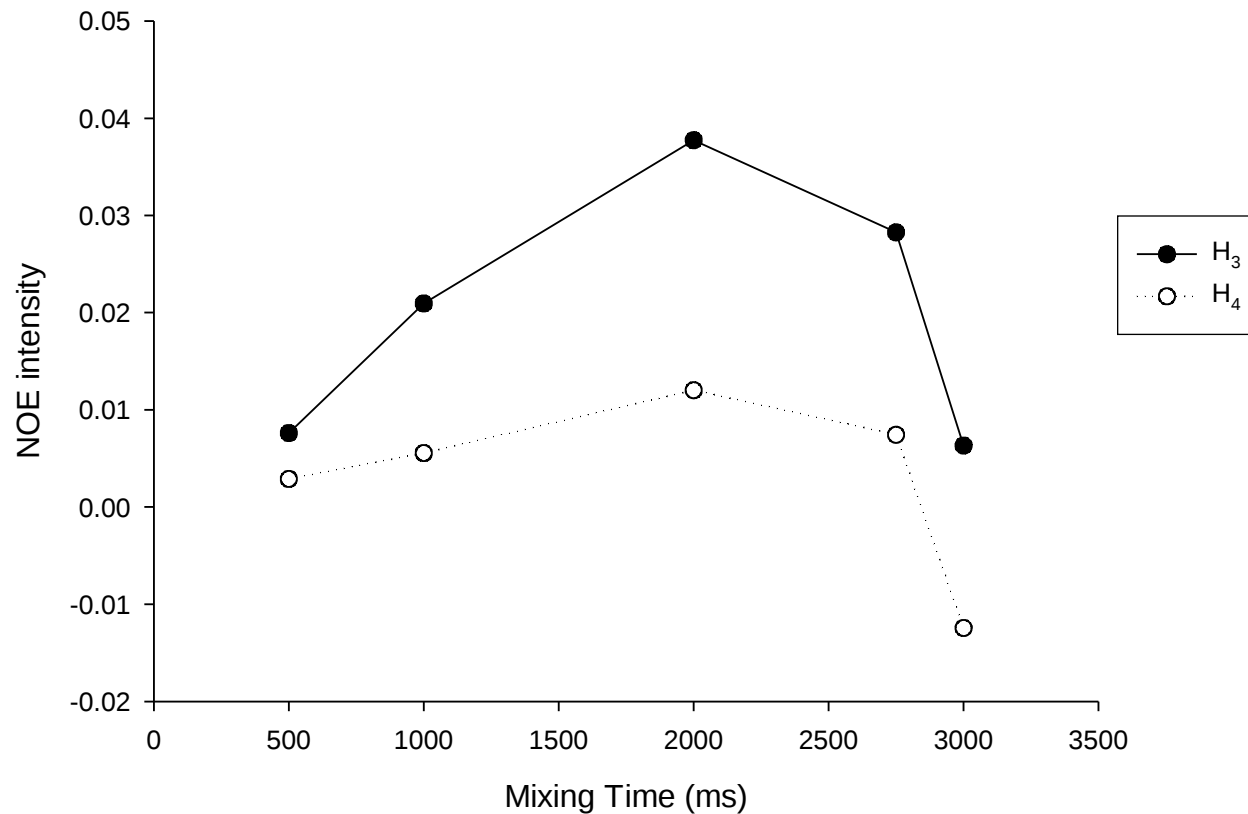
No son idénticos.

- La energía de interacción medida corresponde a la interacción de los grupos metilo de acetilo con benceno.
- Por eso, cuando se eliminan los grupos acetilo la interacción se pierde. No es la entropía, sino la entalpía metilo(acetilo)-aromático.

- Para el compuesto penta-*O*-acetilado el calor de sublimación es de $144.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ que concuerda con la baja presión de vapor del compuesto. La energía de interacción con benceno es de $-132.5 \text{ kJ mol}^{-1}$, el más estable de todos los complejos.
- No existe interacción CH/ π porque el ambiente es repulsivo, así que si se resta el calor de solvatación de la manosa se tiene una diferencia de $-53.7 \text{ kJ mol}^{-1}$, lo que lleva a una interacción de $-10.7 \text{ kJ mol}^{-1}$, interaction por cada metilo que interactúa con benceno.
- Nuestro modelo explica el resultado y la pérdida de la interacción al desacetilar.

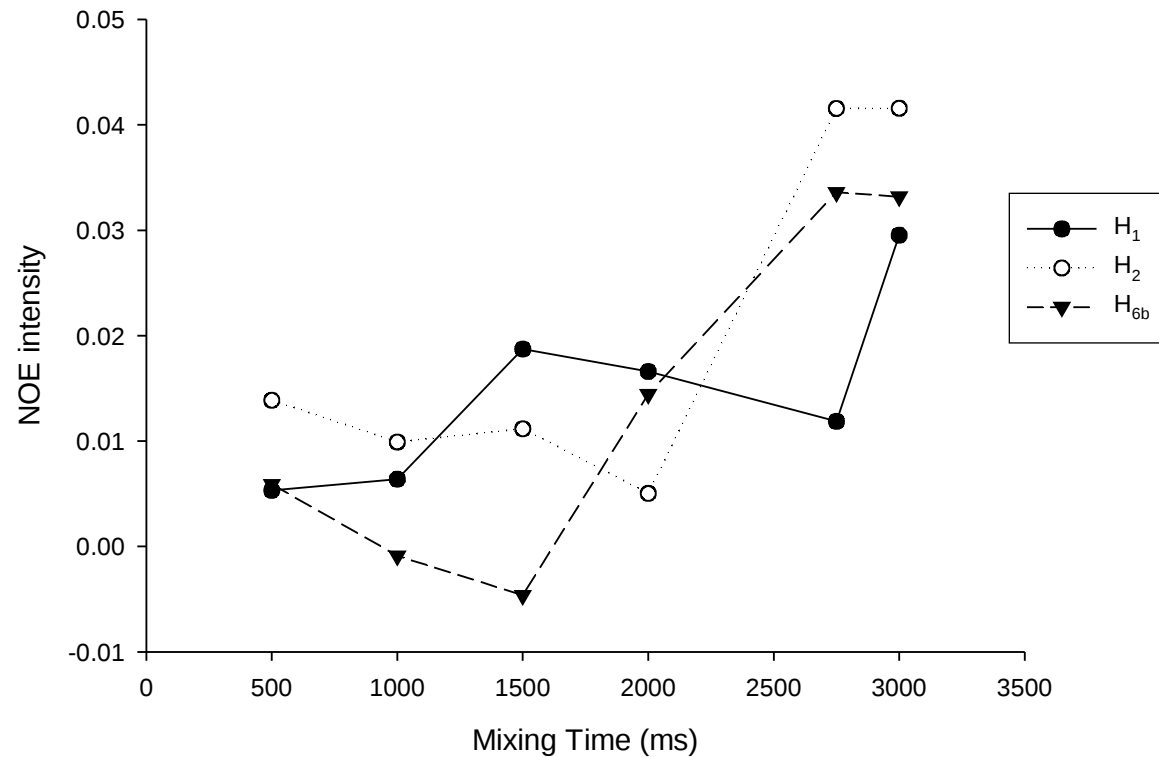
Medición del efecto NOE

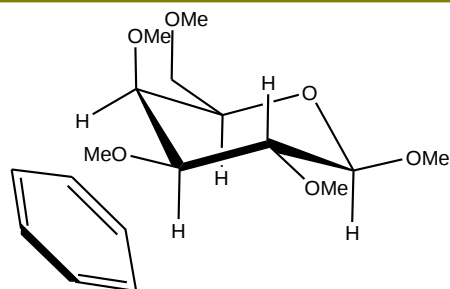
β -galactosa permetilada



Medición del efecto NOE

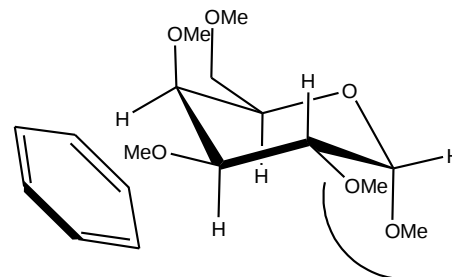
β -galactosa permetilada





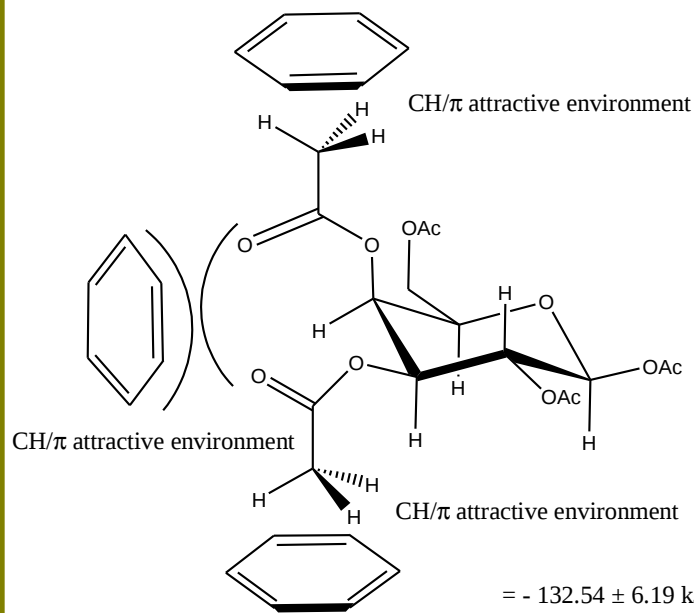
CH/π attractive environment

$$= -89.04 \pm 2.0 \text{ kJ mol}^{-1}$$

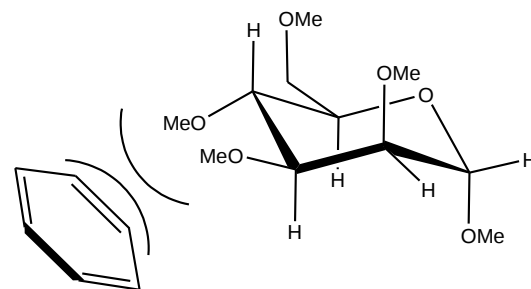


CH/π attractive environment

$$= -88.71 \pm 5.54 \text{ kJ mol}^{-1}$$

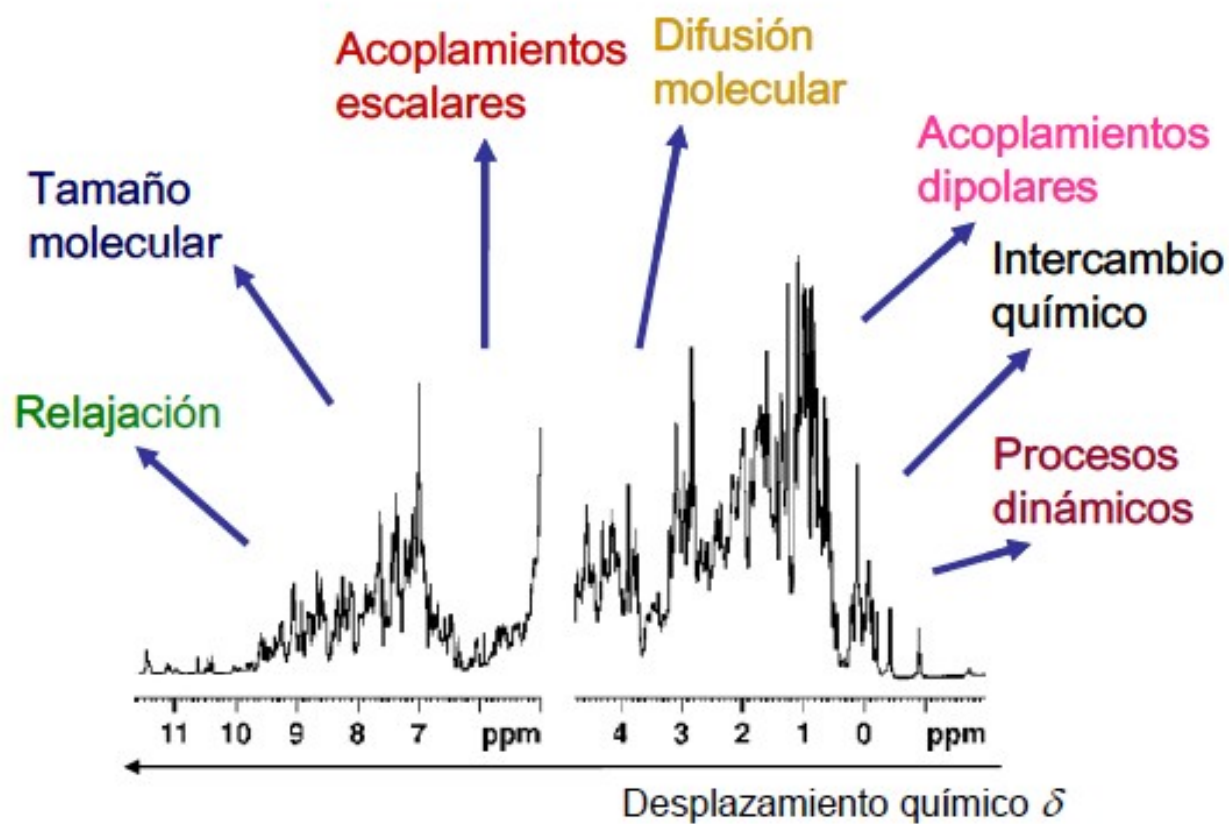


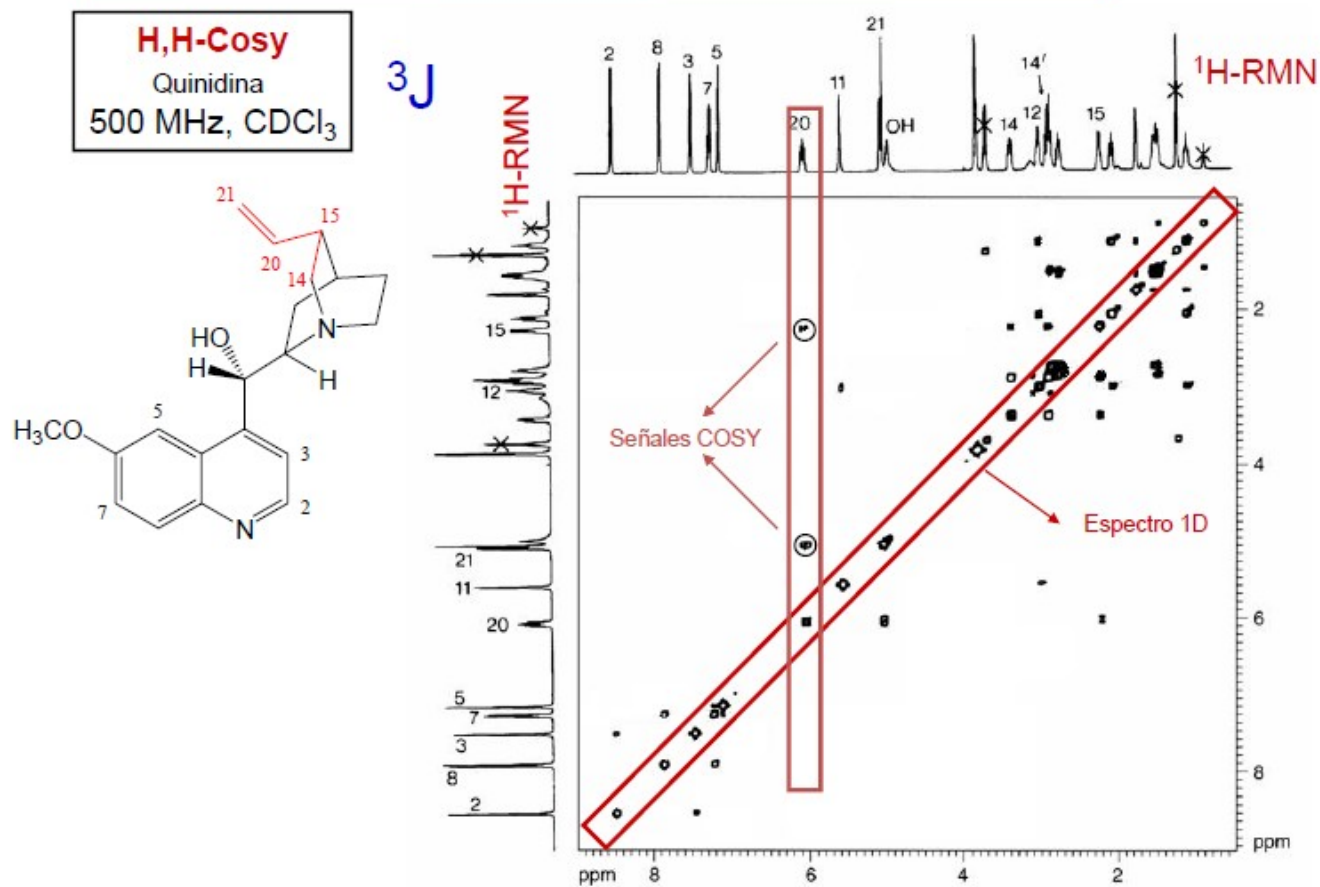
$$= -132.54 \pm 6.19 \text{ kJ mol}^{-1}$$



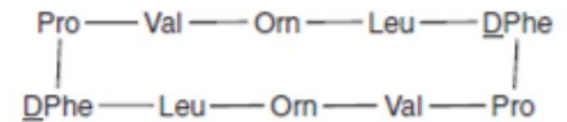
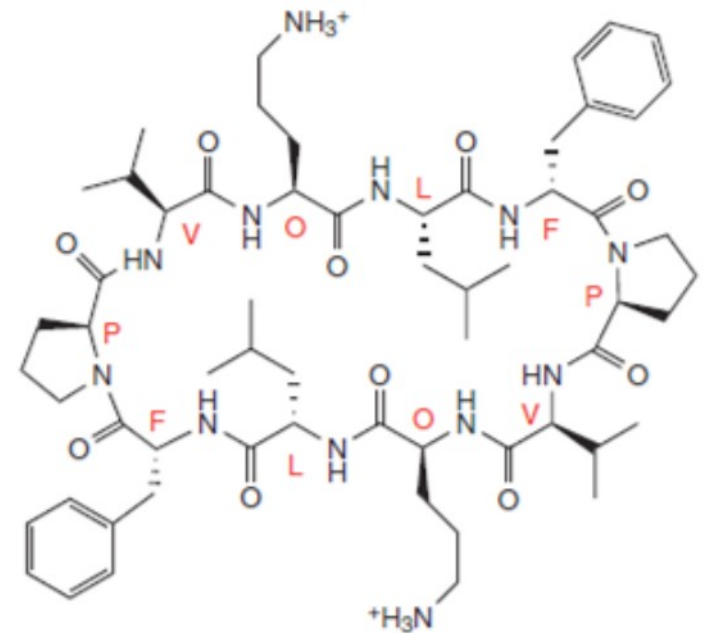
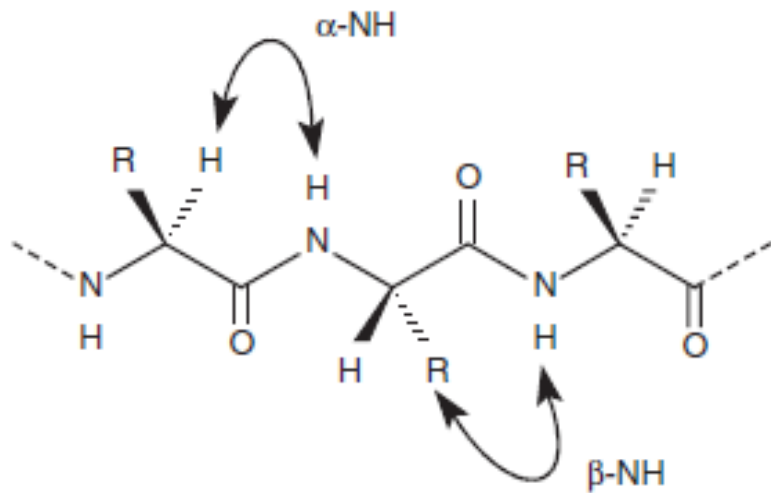
CH/π repulsive environment

$$= -78.8 \pm 3.9 \text{ kJ mol}^{-1}$$

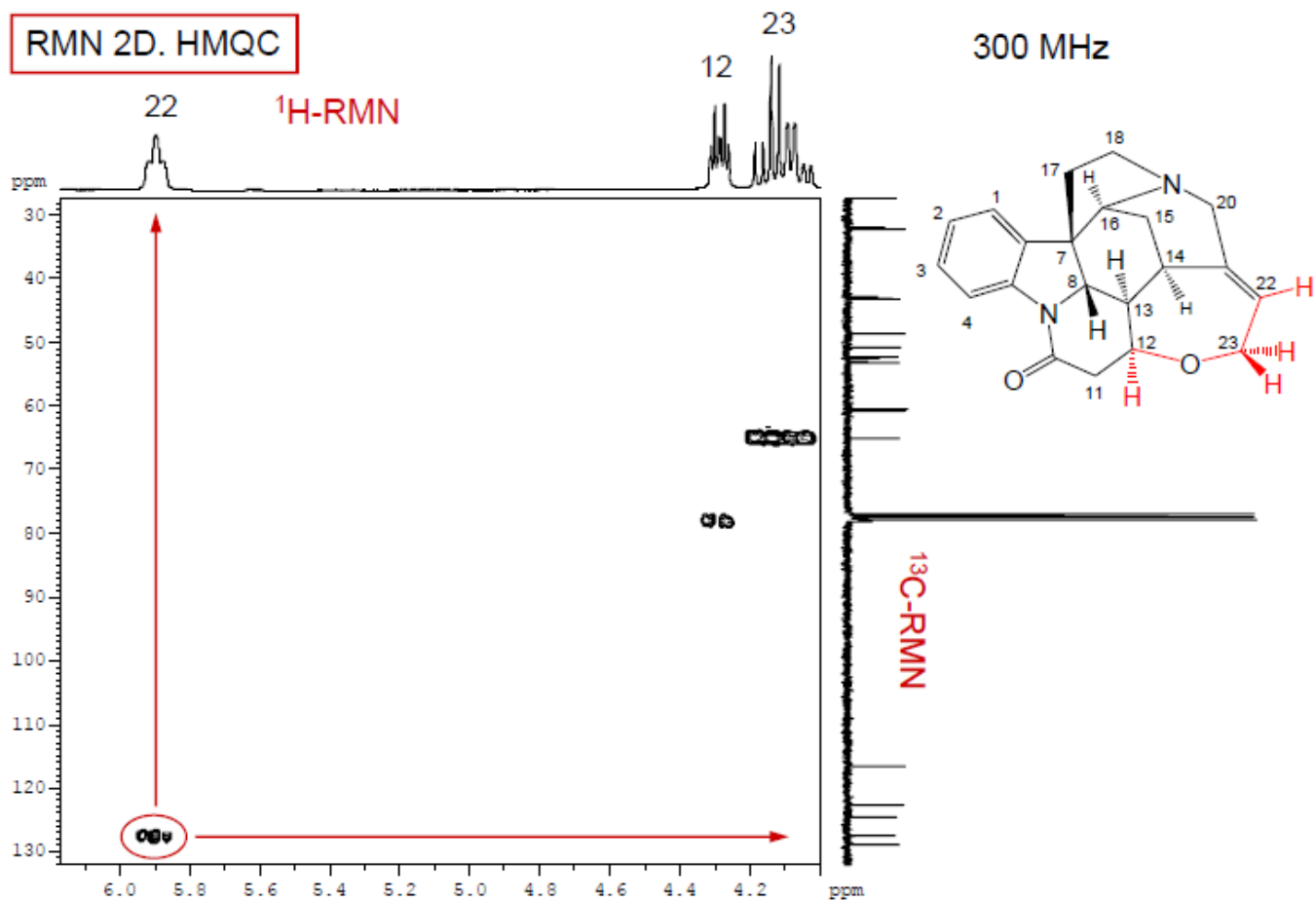




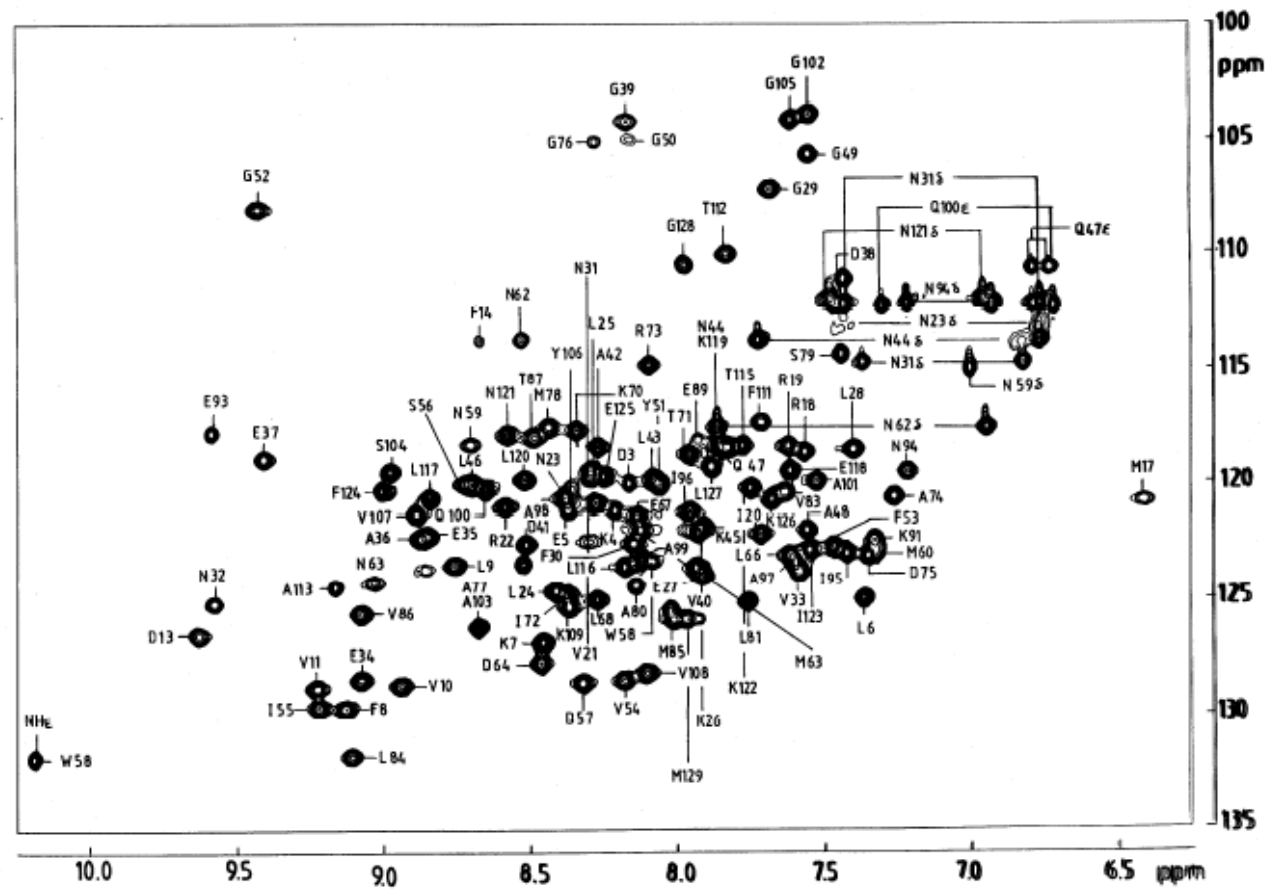
Elucidación estructura primaria



8.18



114

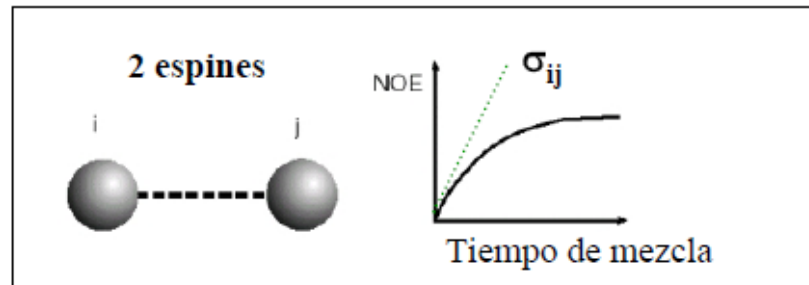


Determinación de distancias experimentales por NOE

115

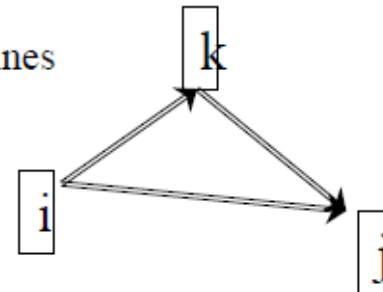
- Aproximación de 2 espines en el límite de tiempos de mezcla cortos: La velocidad inicial sólo depende de la relajación cruzada del par de espines. Si no hay variación en el tiempo de correlación la velocidad inicial sólo depende de la distancia internuclear.

$$A = 1 - R \tau_m \longrightarrow a_{ij} = -\sigma_{ij} \tau_m \propto 1/r_{ij}^6$$



- En general se debe considerar toda la red de espines

$$a_{ij} = -\sigma_{ij} \tau_m + \sum \sigma_{ik} \sigma_{kj} \tau_m^2 + \dots$$



Simulación de NOE: programa NOEPROM

116

□ Características:

- NOE estacionario, 2D NOESY y 2D ROESY
- Equilibrio conformacional
- Simulación simultánea de toda la red de protones
- Flexibilidad. Modelos dinámicos



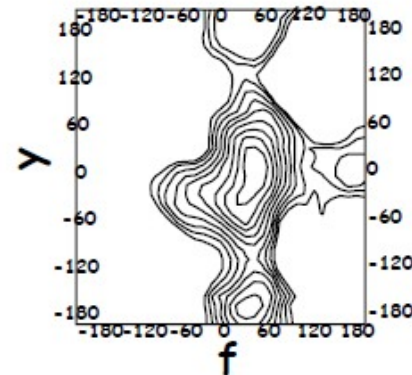
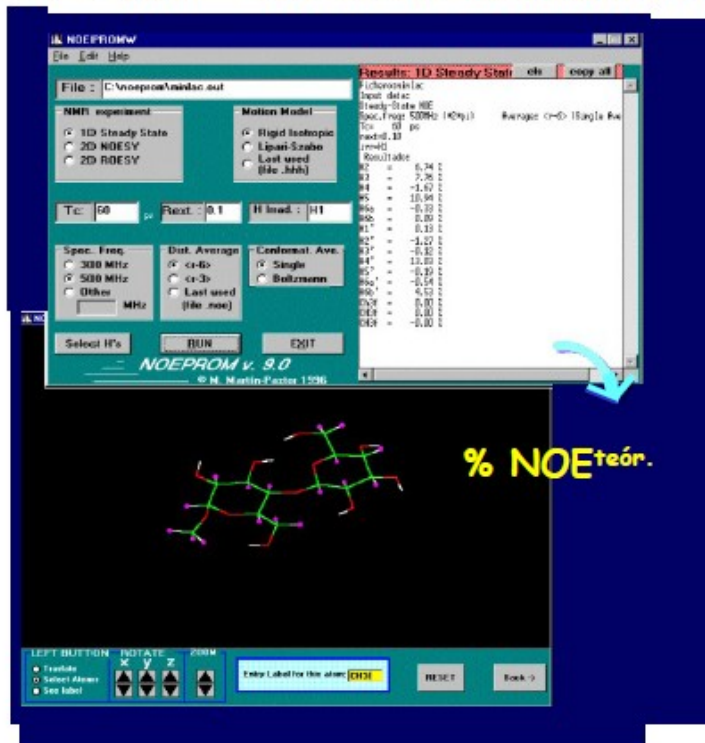
Cálculos de NOE con matriz de relajación completa

117

- El NOE teórico puede calcularse a partir de la/s

$$\left(A = \exp [-R^{\text{teór.}} \tau_m] \right) \longleftrightarrow R = -\ln[A^{\text{teór.}}] / \tau_m$$

NOEPROM: Tratamiento de múltiples conformaciones: Mapas de Energía, MD, SA,



Caso inverso: Deducción de la estructura a partir de datos

118

NOE

- Problemas con NOE
 - ▢ Ambigüedades en la asignación: quiralidad, pro-quiralidad, traslape de señales → considerar un conjunto de posibles asignaciones del NOE.
 - ▢ Falta de asignación, asignación incorrecta, ruido, equilibrio conformacional, traslape en el pico diagonal.
 - ▢ Distancias imprecisas → introducir un cierto margen de error en la distancia permitida. Su efecto no es demasiado crítico, si se tiene un número suficiente de restricciones en esta zona de la molécula.
 - ▢ Matriz de distancias incompleta
 - ▢ Matriz R incompleta

Introducción de restricciones NOE en cálculos moleculares

119

MM

Metodo I Restricciones de distancia fijadas previamente deducidas a partir de la intensidad del NOE se introducen en el cálculo de la energía



$$d_{A-B} < d_{\max}$$

La optimización de la geometría se realiza mediante MM incluyendo un término de pseudo-energía basado en las distancias NOE calculadas

$$E = E_{MM} + E_{\text{dist.}} + \dots$$

$$E_{\text{dist.}} = \sum f(r_{ij} - r_{ij}^0)$$

funcion biarmónica

$$f(r_{ij} - r_{ij}^0) = \begin{cases} 0 & \text{Si } r \leq r_0 \\ (r - r_0)^n & \text{Si } r > r_0 \end{cases}$$

Otras posibilidades de f : funcion cuadrada, cuadrada suavizada ó simétrica

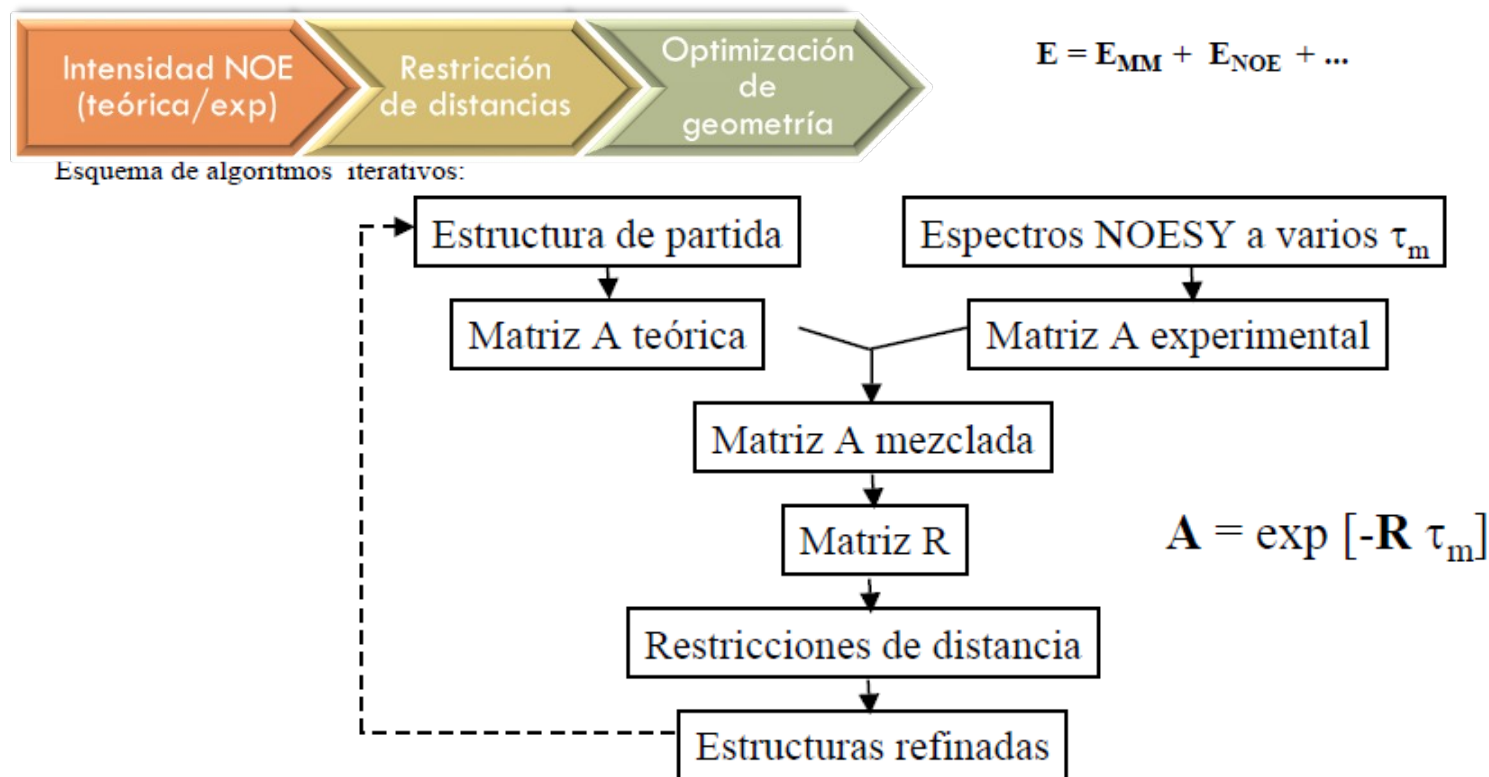
r_0 valor deseado de distancia

Introducción de restricciones NOE en cálculos moleculares

120

MM

- **Metodo II** Se simula el propio efecto NOE con matriz R durante el refinamiento



Programas: IRMA, MARDIGRAS, CANDID, DINOSAUR, HADDOCK ...

Güntert et al., *J. Mol. Biol.*, 2002, **319**, 209-227

Dominguez, C. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 1731 - 1737

α -Sarcina

121

