



**CURSO CeBEM – Del 28 de Mayo al 8 de Junio, 2012.**

**FCByF, UNR, Rosario.**

## **“RMN de Macromoléculas Biológicas”**

Director: Dr. Rodolfo M. Rasia ([rasia@ibr.gov.ar](mailto:rasia@ibr.gov.ar))

Docentes: Dr. Rodolfo M. Rasia, Dr. Alejandro J. Vila, Dr. Claudio O. Fernández, Dra. Mariana Gallo, Lic. María Eugenia Zaballa, Lic. Paula Burdisso

### **1. Caracterización e inserción de la asignatura en el contexto de la carrera**

La presente asignatura es electiva para las carreras de Licenciatura en Biotecnología y Licenciatura en Química y se cursa en el 5to año de la carrera.

### **2. Fundamentación**

La función de las macromoléculas biológicas está determinada tanto por su estructura tridimensional como por su dinámica conformacional. Las biomoléculas son sistemas inherentemente flexibles con comportamiento dinámico en un amplio rango de escalas de tiempo, desde los ps a los s. La espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) ha emergido como el método de elección para el estudio simultáneo de la estructura y dinámica de biomoléculas en solución.

En esta asignatura se introduce al estudiante en la teoría de RMN en medio líquido y sus aplicaciones en el estudio de biomoléculas. El foco de la materia está orientado al estudio de proteínas, poniéndose énfasis en la comprensión del fundamento de los experimentos que permiten obtener los espectros que se utilizan en el estudio.

Debido a que la asignatura está basada en el estudio de proteínas es necesario un conocimiento de base de la química y fisicoquímica de las mismas. Resulta por lo tanto necesario haber cursado y aprobado un curso Química Biológica o equivalente, y recomendable haber cursado y aprobado un curso de Biofísica o equivalente.

### **3. Objetivos de aprendizaje**

- a. Que el estudiante maneje los fundamentos teóricos de las secuencias de pulsos que componen un experimento de RMN, su implementación en el espectrómetro y el procesamiento de los datos crudos que se obtienen. Que entienda los procedimientos necesarios para la asignación de las resonancias de los diferentes núcleos.
- b. Que el estudiante comprenda los requerimientos de las muestras necesarias para la

técnica en cuanto a marcación isotópica, concentración y medio de disolución y que conozca los métodos empleados para realizar marcaciones isotópicas.

- c. Que el estudiante conozca el flujo de trabajo que supone la resolución de estructuras tridimensionales de proteínas por RMN.
- d. Que el estudiante entienda la relación entre la relajación de las señales y la dinámica de las moléculas en estudio.

#### **4. Contenidos**

##### **a. Fundamentos de RMN**

Transiciones y niveles de energía. Acoplamiento entre espines. Experimentos de RMN. Modelo vectorial. Marco rotatorio, desplazamiento. Pulsos de RF. Detección, fase relativa. Transformada de Fourier y procesamiento de datos. El espectrómetro de RMN. Digitalización de la señal y detección en cuadratura. (1 sesión)

##### **b. Formalismo de operadores producto**

Mecánica cuántica, matriz densidad, operadores. Hamiltonianos para pulsos y esperas. Operadores para dos o más espines. Ecos de spin en sistemas homonucleares y heteronucleares. Transferencia de magnetización. INEPT. Términos cuánticos múltiples. (1 sesión teórica, 1 práctica)

##### **c. RMN multidimensional**

Transformada de Fourier en dos dimensiones. Correlaciones a través del acoplamiento escalar. COSY. Correlaciones heteronucleares. HMQC, HSQC. Análisis por operadores producto. Modos de adquisición indirecta. Discriminación de frecuencias y formas de líneas. Secuencias de pulsos de RMN heteronuclear para proteínas. Constantes de acoplamiento y transferencia de magnetización. Bloques de secuencias de pulsos. Excitación selectiva en  $^{13}\text{C}$ . Supresión del  $\text{H}_2\text{O}$ . Experimentos de triple resonancia. (3 sesiones teóricas, 1 práctica en el espectrómetro, 1 práctica de procesamiento de datos)

##### **d. Marcado de proteínas**

Marcado isotópico con  $^{15}\text{N}$  y  $^{13}\text{C}$ . Deuteración parcial y perdeuteración. Marcación selectiva. Reprotonación selectiva. Marcado con sondas paramagnéticas. (1 sesión)

##### **e. Asignación de resonancias en proteínas**

Asignación secuencial de  $^1\text{H}$  en proteínas no marcadas. Proteínas marcadas en  $^{15}\text{N}$ . HSQC-TOCSY y HSQC-NOESY. Proteínas con doble marca. Asignación secuencial del esqueleto por experimentos de triple resonancia. Asignación de cadenas laterales. Programas de asignación automática. Espectroscopia de proyección y covariancia. (2 sesiones teóricas, 2 prácticas)

##### **f. Relajación y dinámica en proteínas**

Definiciones. Mecanismos de relajación. Movimiento aleatorio: función de correlación, densidad espectral y regímenes de movimientos. Relajación longitudinal. NOE. Relajación transversal: interacción bipolar y anisotropía de desplazamiento químico. Correlación cruzada. Relajación en proteínas. Dinámica. Modelos. Experimentos para medición de  $T_1$ ,  $T_2$  y NOE heteronuclear. (2 sesiones)

##### **g. Cálculo de estructuras**

Restricciones de distancia a partir de NOEs. Asignación asistida y automática. Restricciones de ángulos diedros a partir de acoplamientos escalares. Restricciones orientacionales a partir de acoplamientos residuales dipolares. Funciones de energía. Minimización de energía y recocido simulado. Programas para cálculos de estructuras: XPLOR, ARIA-CNS, CYANA (2 sesiones)

#### **h. RMN en sistemas paramagnéticos**

Acoplamiento electrón-núcleo. Influencia en el desplazamiento químico: desplazamiento de contacto y pseudocontacto. Influencia en la relajación nuclear: relajación de contacto, dipolar y de Curie. Estrategias de asignación y adecuación de secuencias de pulso a proteínas paramagnéticas. Empleo de restricciones paramagnéticas para cálculo y refinamiento de estructuras. Uso de sondas naturales e incorporadas (1 sesión).

#### **i. Acoplamientos dipolares residuales (RDC)**

Acoplamiento dipolar en muestras parcialmente alineadas. Tensor de alineamiento. Obtención de restricciones orientacionales. Aplicación al cálculo de estructuras. Dinámica por RDC. Métodos de alineamiento de proteínas en el campo. Experimentos para medición de RDCs. (1 sesión)

#### **j. RMN de ácidos nucleicos**

Espectros de  $^1\text{H}$  en la región imino. Estructura secundaria a partir de NOESY en la región imino. HSQC y HNN-COSY en muestras marcadas con  $^{15}\text{N}$ . Asignación completa: bases y ribosa. Correlación de la base a la ribosa. Análisis conformacional por desplazamientos químicos. Determinación de la estructura local y global (1 sesión).

### **5. Metodología de enseñanza y aprendizaje**

El curso se dictará en forma de sesiones teóricas de tres horas de duración, según se detalla en los contenidos. Adicionalmente se realizarán las siguientes prácticas de tres horas de duración:

- a. En el aula, evaluación de secuencias de pulsos según el formalismo de operador producto (dos sesiones).
- b. En el laboratorio de RMN, procesamiento de datos y asignación de proteínas (dos sesiones).
- c. En el espectrómetro, puesta a punto de la muestra y adquisición de espectros (una sesión).

El curso completo comprenderá 20 sesiones para una duración total de 60 horas

### **6. Evaluación y acreditación**

La condición de regular se adquirirá con un 85% de asistencia a las clases y la aprobación de un seminario sobre el tema. El examen para los alumnos regulares consistirá en la resolución escrita de una serie de problemas a libro abierto. Los alumnos libres deberán además aprobar un examen práctico sobre evaluación de secuencias utilizando el formalismo de operadores productos, asignación de un fragmento de proteína a partir de espectros standard, y puesta a punto de experimentos en el espectrómetro.

### **7. Bibliografía:**

Malcolm H. Levitt "Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance"

James Keeler "Understanding NMR Spectroscopy"

John Cavanagh, Wayne J. Fairbrother, Arthur G. Palmer III, Nicholas J. Skelton "Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice"

Quincy Teng "Structural Biology. Practical NMR applications"