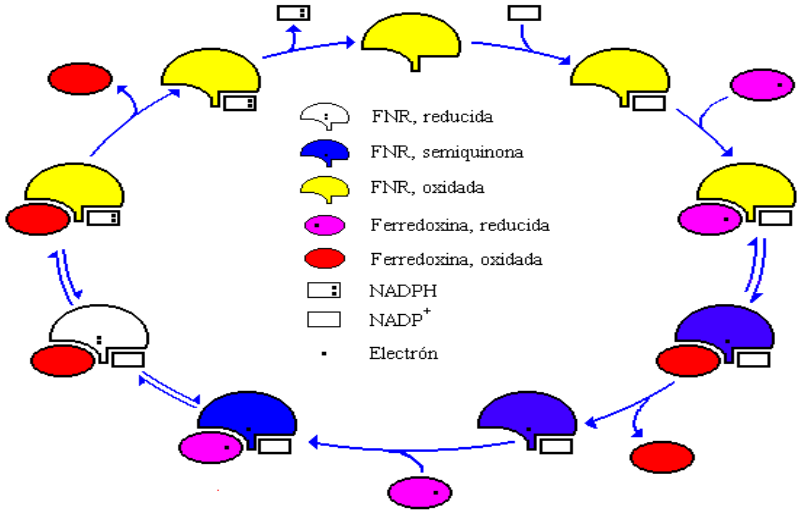
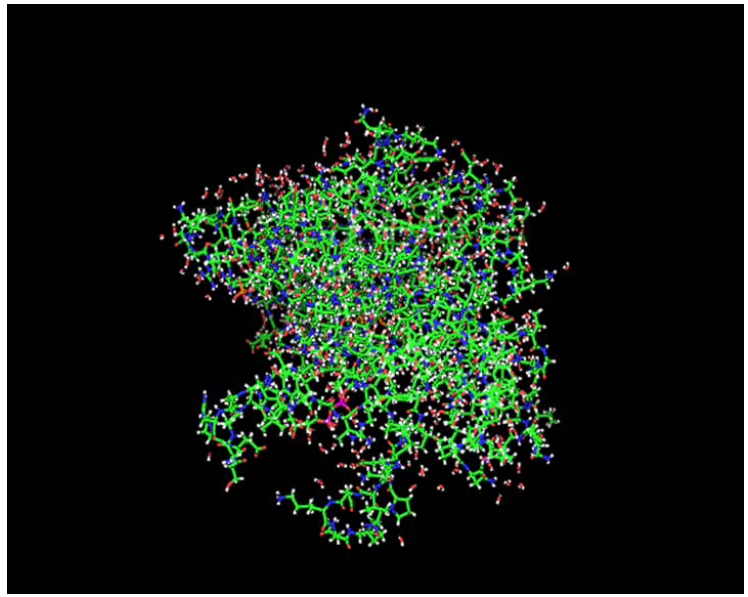
CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE BIOMOLÉCULAS

- ✓Interacción radiación-materia:
  - ✓Técnicas de dispersión (elástica): difracción de rayos X, electrones, neutrones...
  - ✓Técnicas inelásticas (espectroscopias):
    - ✓NMR
    - ✓EPR
    - ✓Espectroscopias ópticas
    - ✓Raman
    - ✓...
- ✓Microscopias atómicas

¿Caracterización estructural?





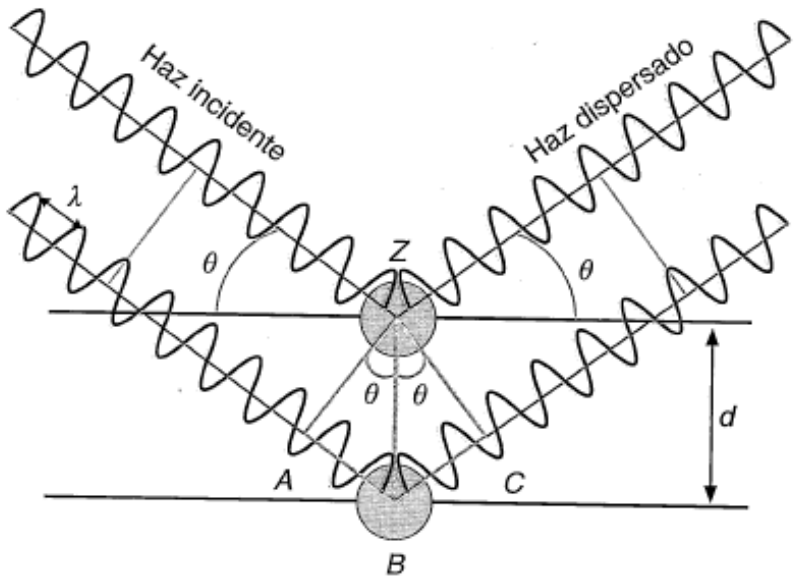
¿Cómo es posible?

✓Purificación de macromoléculas biológicas: Cromatografías

DIFRACCIÓN DE RAYOS X EN MACROMOLÉCULAS BIOLÓGICAS

Fundamento teórico:

✓Ley de Bragg



$AB + BC = n\lambda$ $\quad$ $AB = BC$

$2AB = n\lambda$ $\quad$ $\text{sen}\ \theta = AB/d$

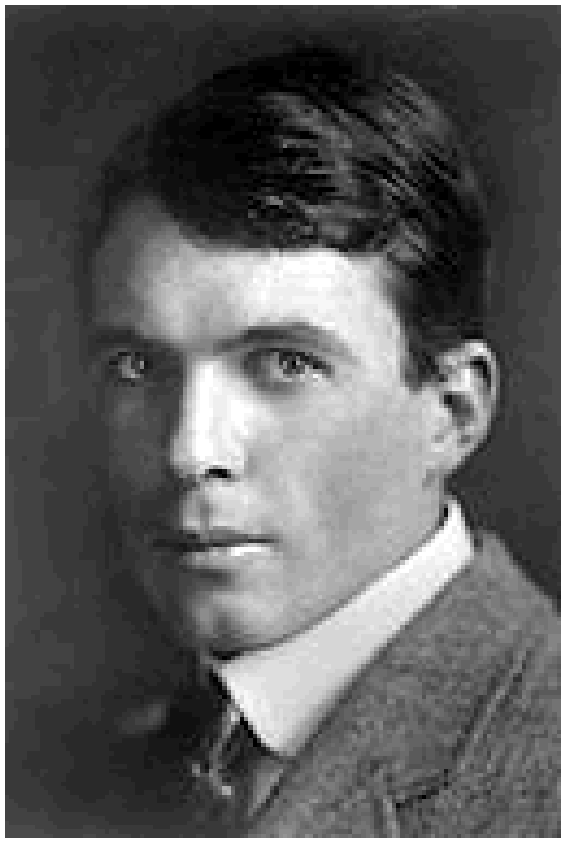
$\text{sen}\ \theta = n\lambda/2d$

$2d\ \text{sen}\ \theta = n\lambda$

✓¿Pueden las macromoléculas biológicas organizarse en cristales?

✓¿Puede obtenerse la estructura de un cristal de proteína?

DIFRACCIÓN DE RAYOS X



William Lawrence Bragg

Maurice Wilkins

Rosalind Franklin

Max Perutz

John Cowdery Kendrew

DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Esquema general:

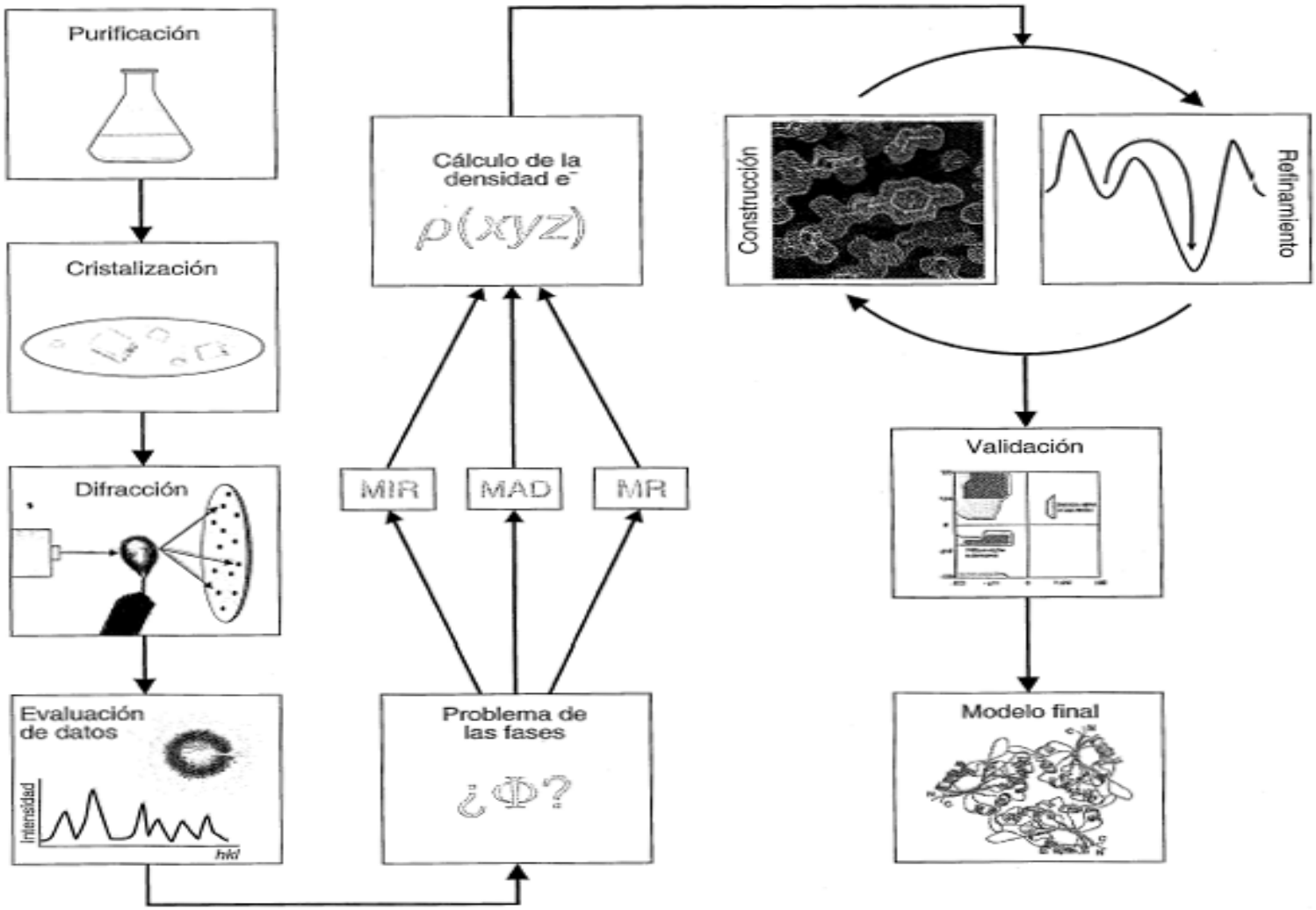


FIG. 10.1. *Esquema de las distintas etapas que configuran un estudio estructural mediante Cristalografía de rayos X.*

DIFRACCIÓN DE RAYOS X

CRECIMIENTO DE CRISTALES DE PROTEÍNAS

Se crecen a partir de disoluciones (acuosas)

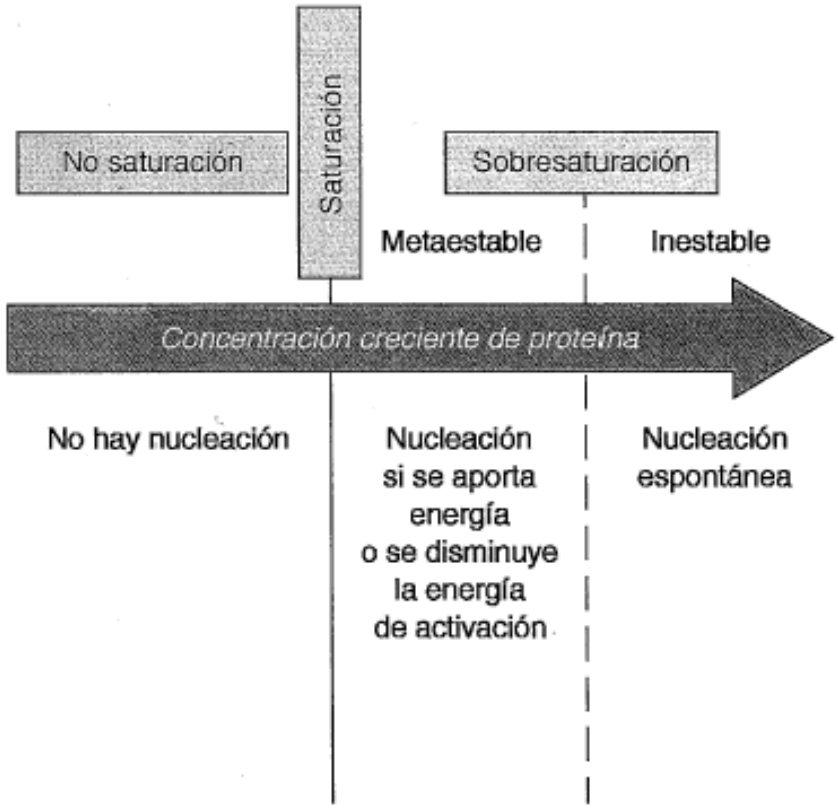


FIG. 9.2. *Esquema muy simplificado de la relación entre el grado de saturación y la formación de cristales.*

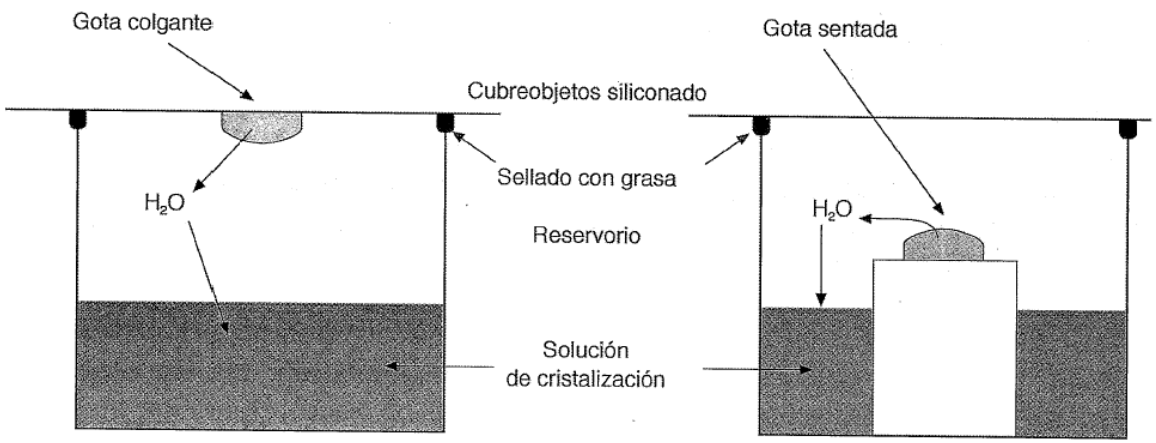
DIFRACCIÓN DE RAYOS X

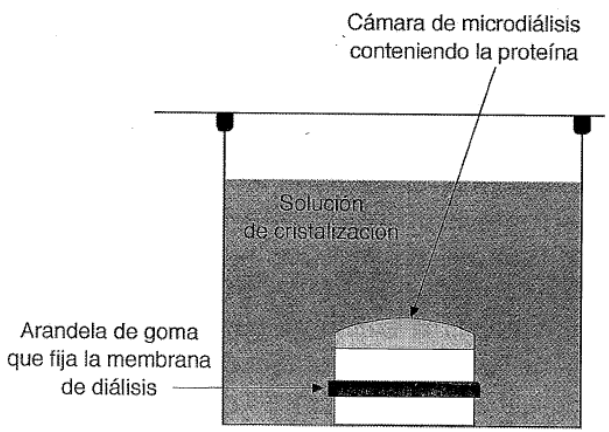
Características de la muestra de proteína para cristalización:

- ✓Alta concentración
- ✓Alta pureza
- ✓Alta homogeneidad
- ✓Alta estabilidad

Métodos para la obtención de la sobresaturación:

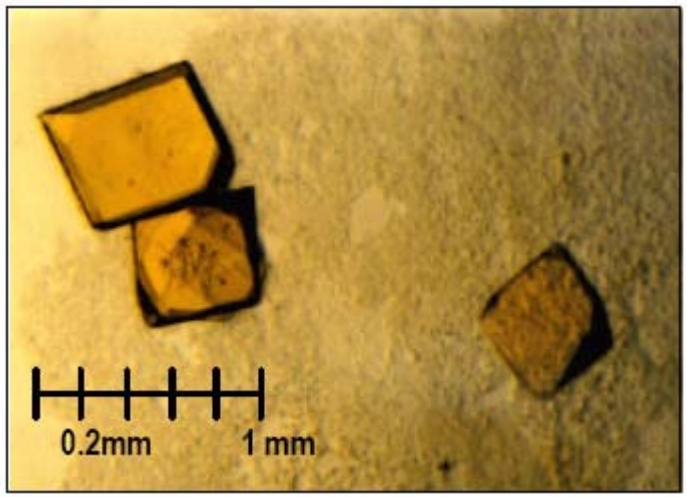
- ✓Control de la Evaporación
- ✓Control del pH
- ✓Control de la temperatura
- ✓Control de la concentración salina
- ✓Uso de precipitantes
- ✓Inclusión de sustratos

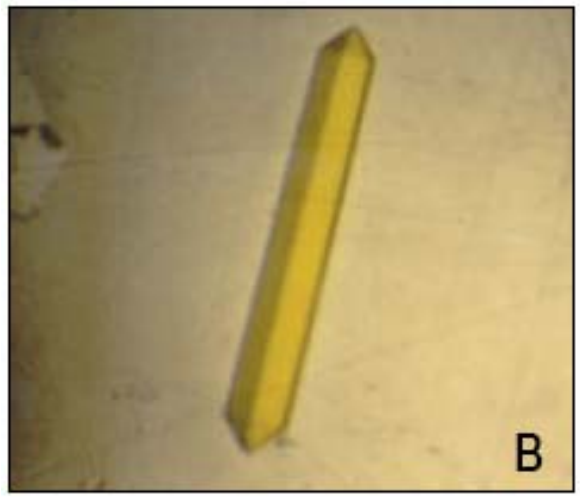




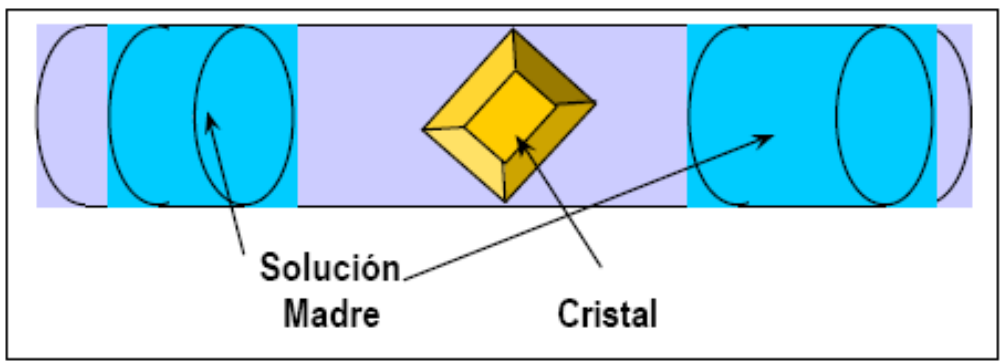
DIFRACCIÓN DE RAYOS X

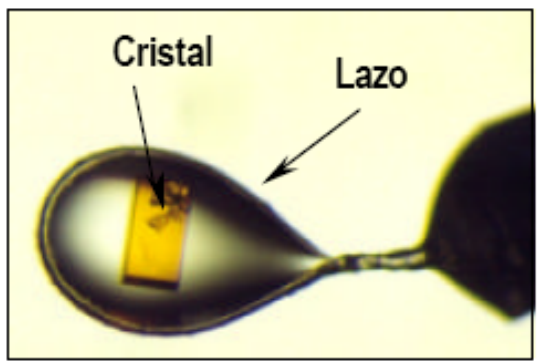
Obtención de monocristales:





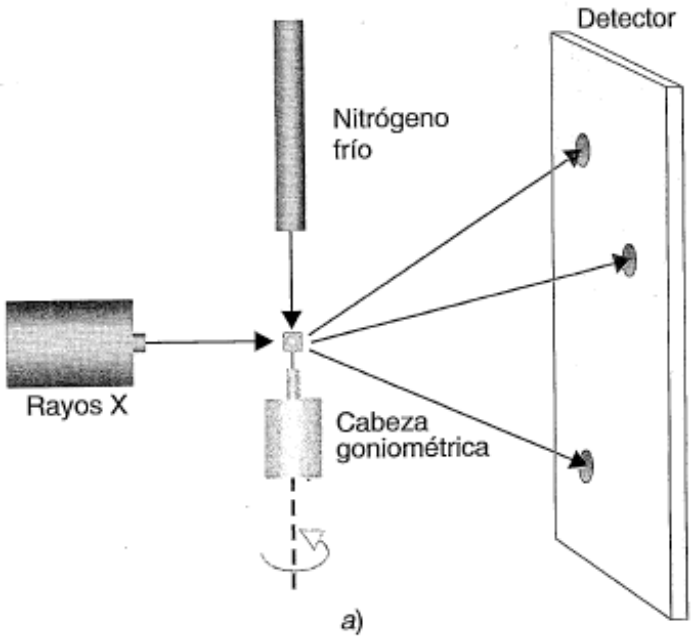
Cristales inestables (pérdida de agua):

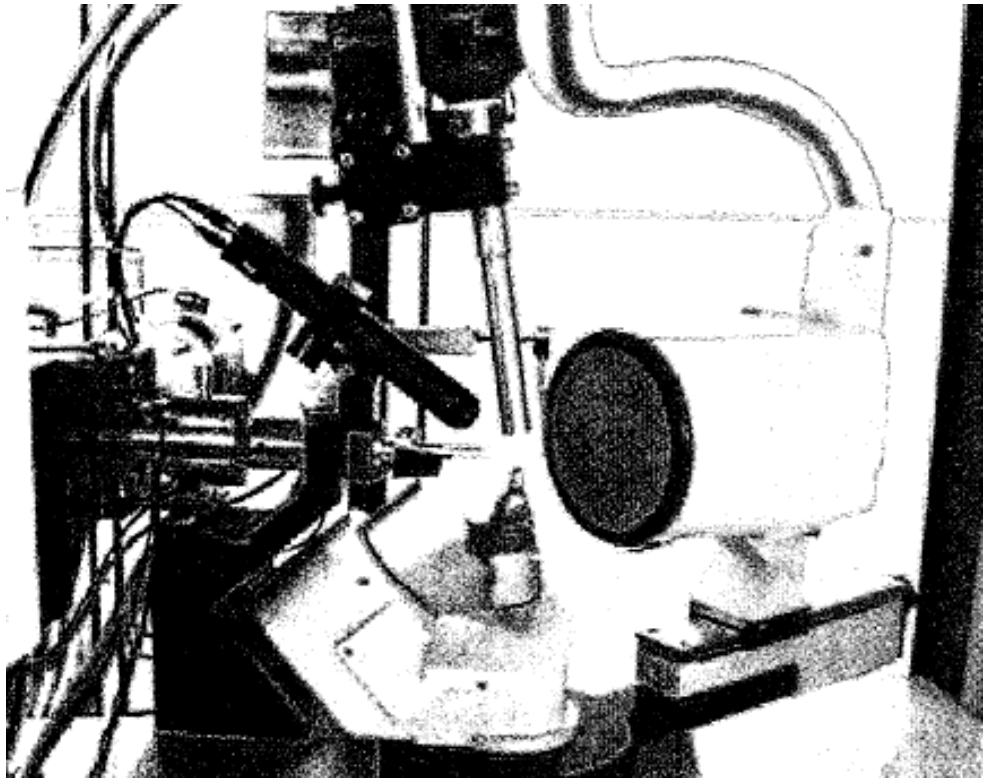




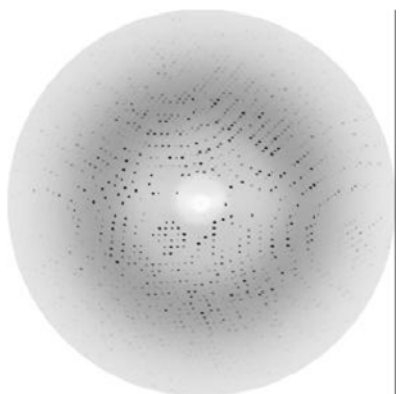
DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Fuentes de rayos X y difractómetros



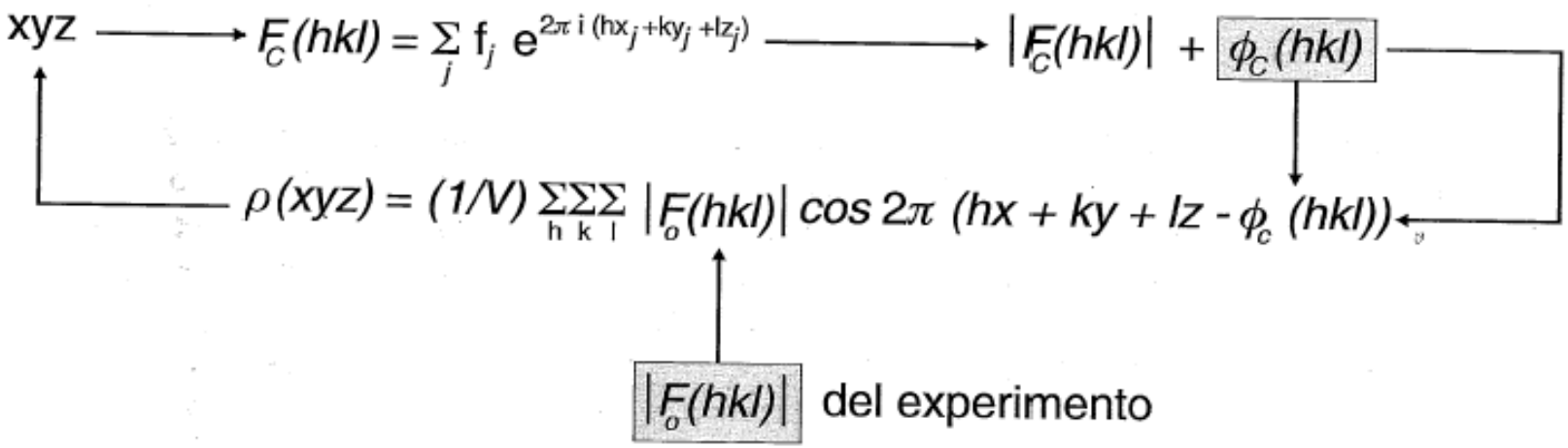


Patrón de difracción obtenido



DIFRACCIÓN DE RAYOS X

El problema de la fase



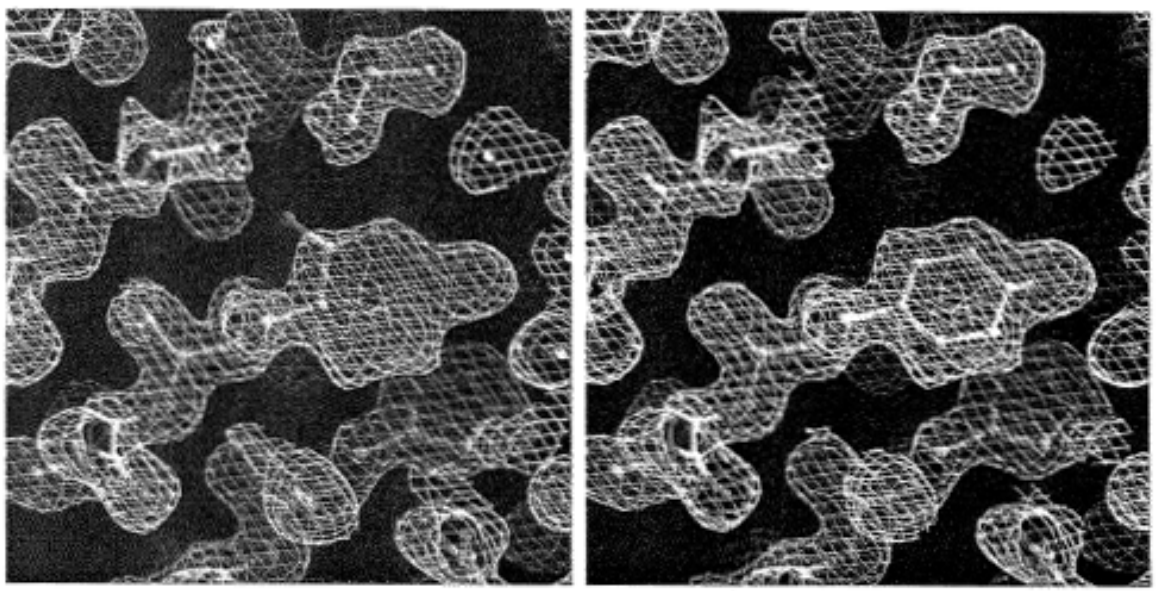
Función de Patterson:

$$P(u,v,w) = \frac{1}{Vc} \sum_{hkl}\sum\sum |F(hkl)|^2 \cos 2\pi (hu + kv + lw)$$

DIFRACCIÓN DE RAYOS X

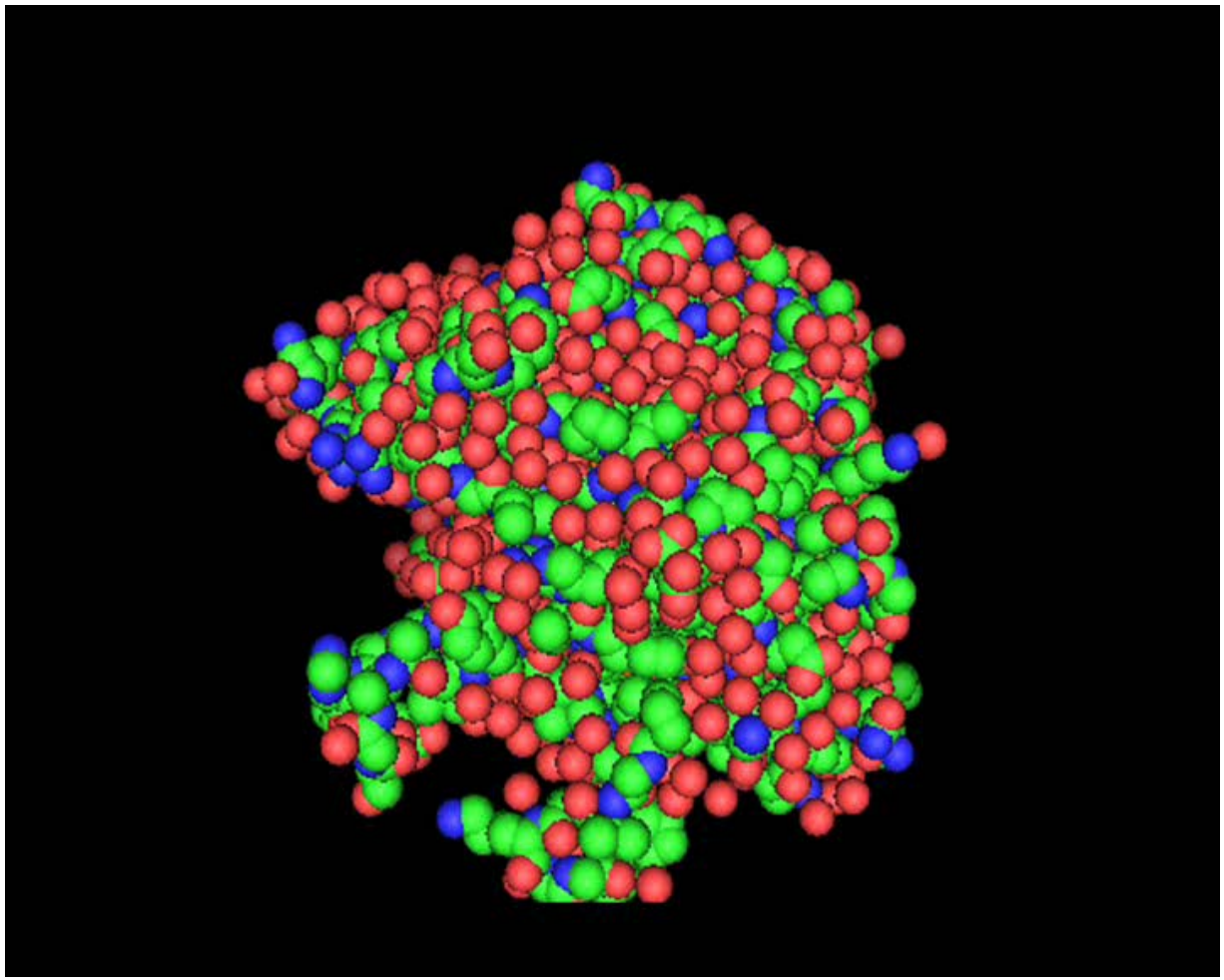
- ✓Métodos de resolución estructural (solución al problema de la fase):
  - ✓Métodos directos
  - ✓Método de reemplazamiento múltiple isomorfo (MIR)
  - ✓Método de dispersión anómala múltiple (MAD)
  - ✓Método de reemplazamiento molecular (MR)

- ✓Refinamiento estructural



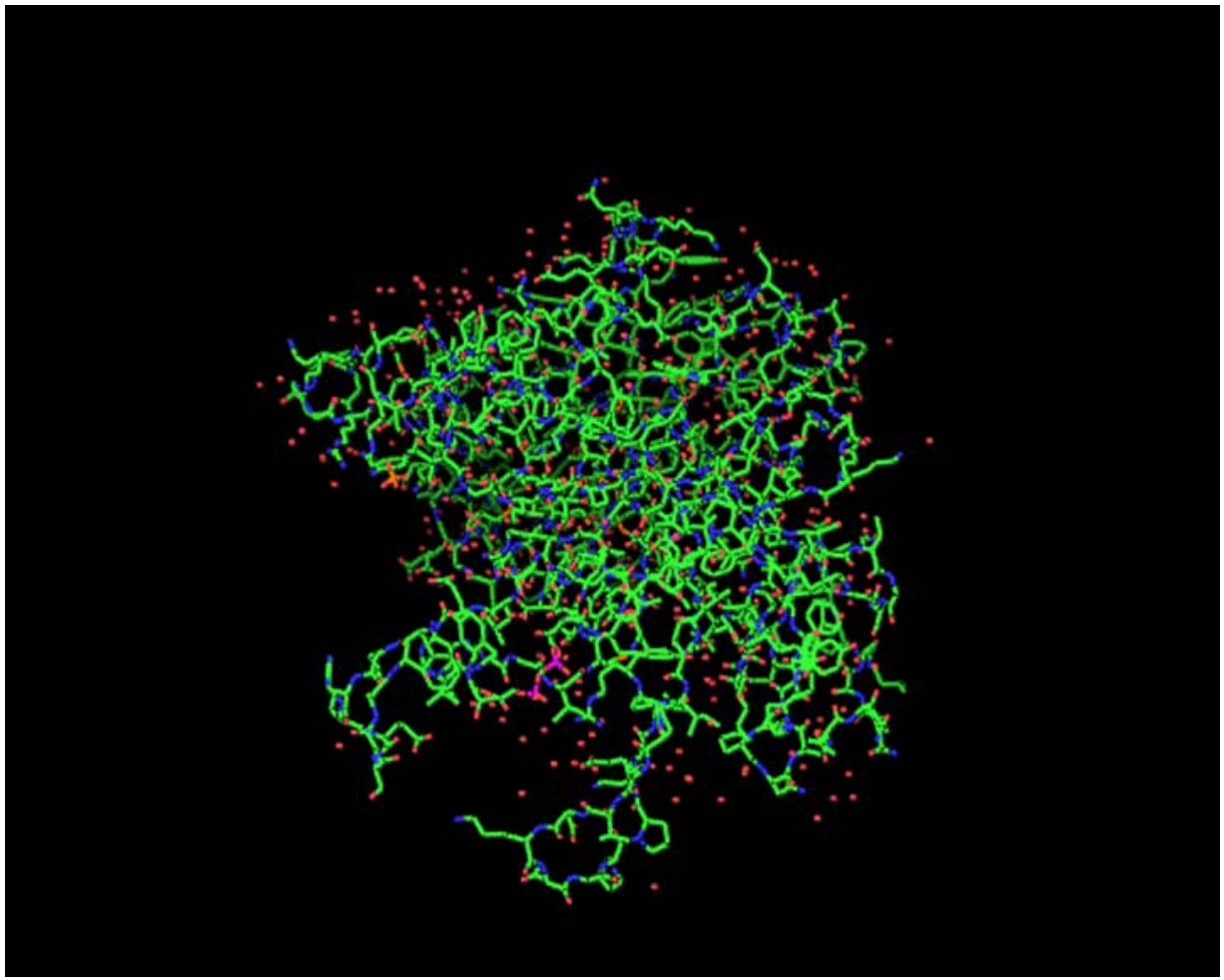
DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Estructura obtenida: representaciones



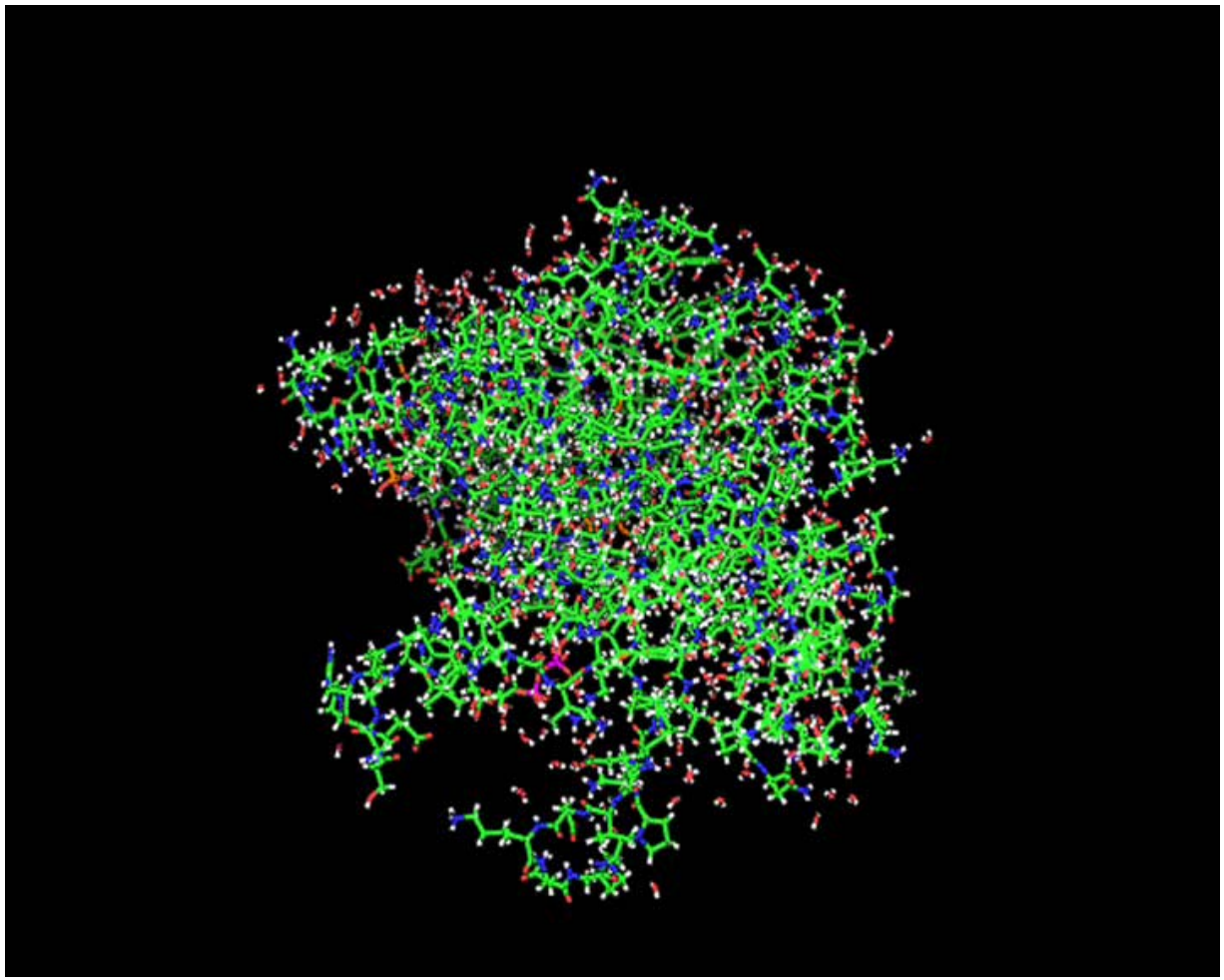
DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Estructura obtenida: representaciones



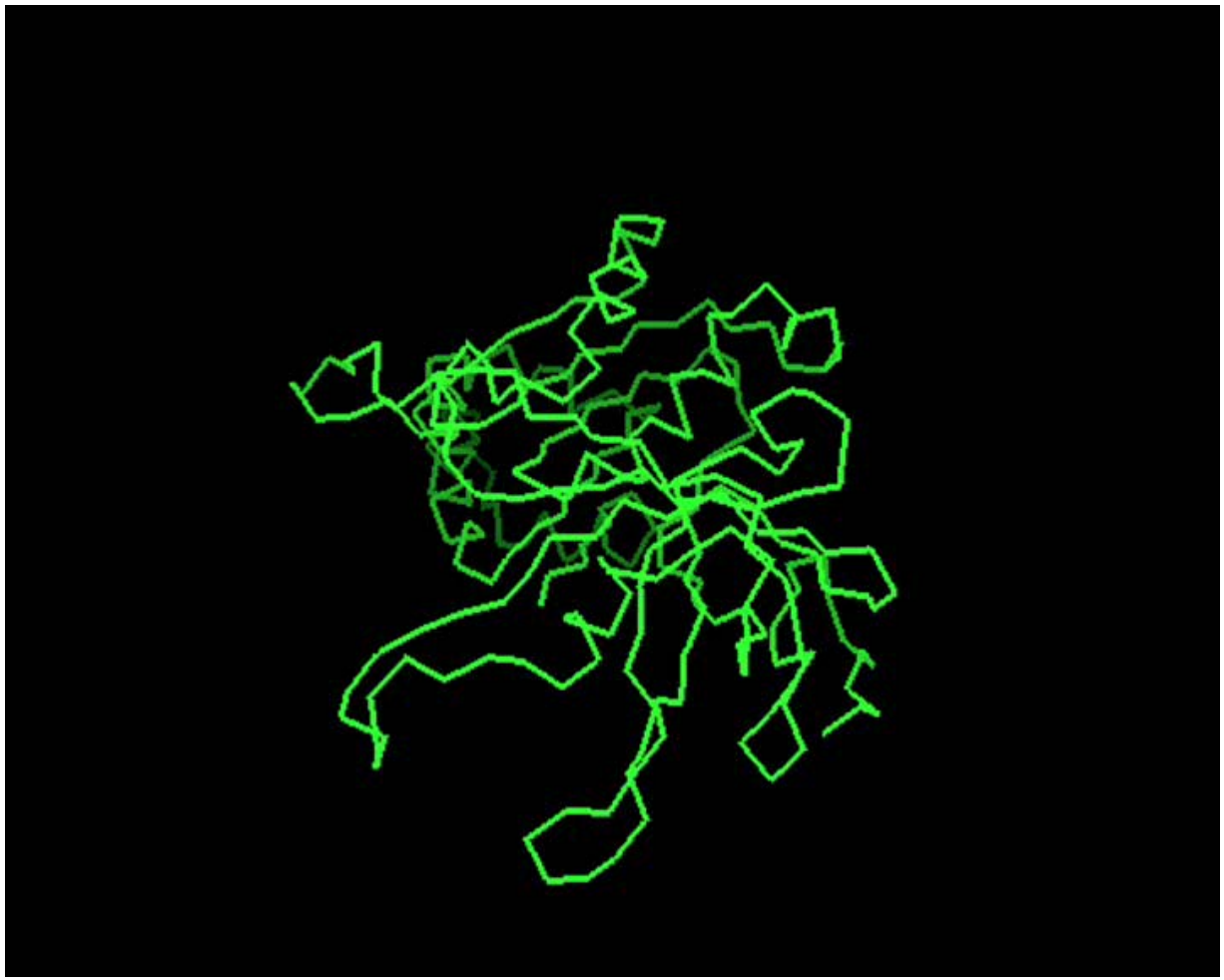
DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Estructura obtenida: representaciones



DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Estructura obtenida: representaciones

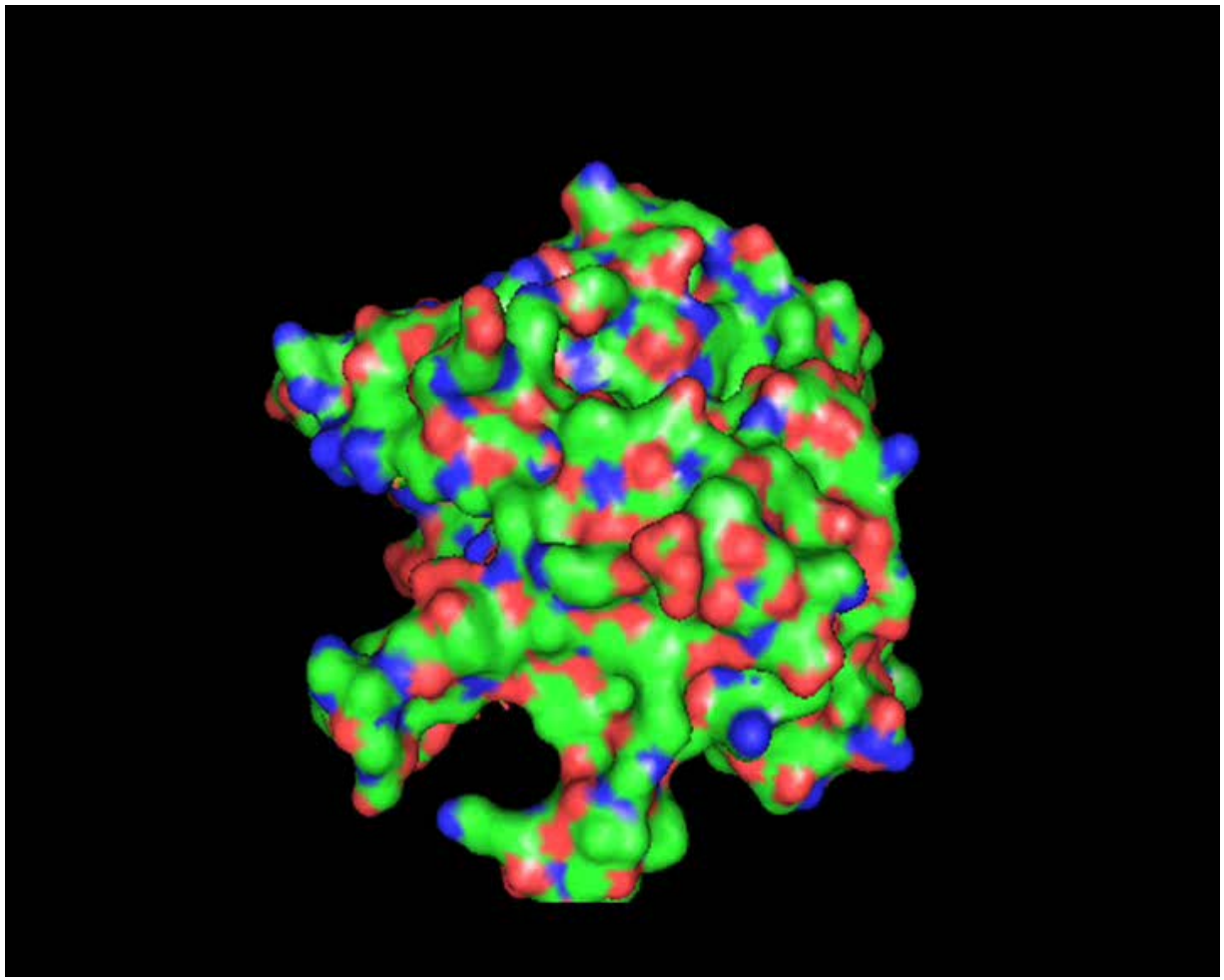


DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Estructura obtenida: representaciones

DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Estructura obtenida: representaciones

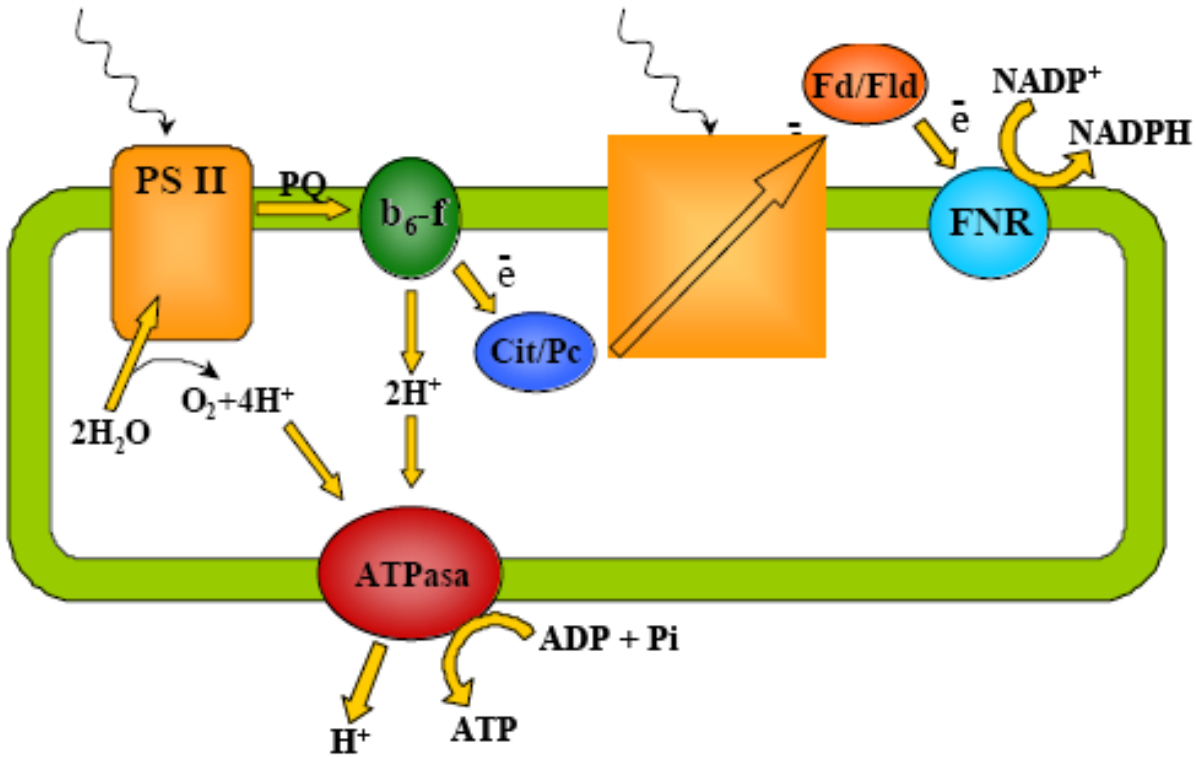


“Protein Data Bank”: registro accesible de los varias decenas de miles de estructuras resueltas de proteínas: www.pdb.org

DIFRACCIÓN DE RAYOS X

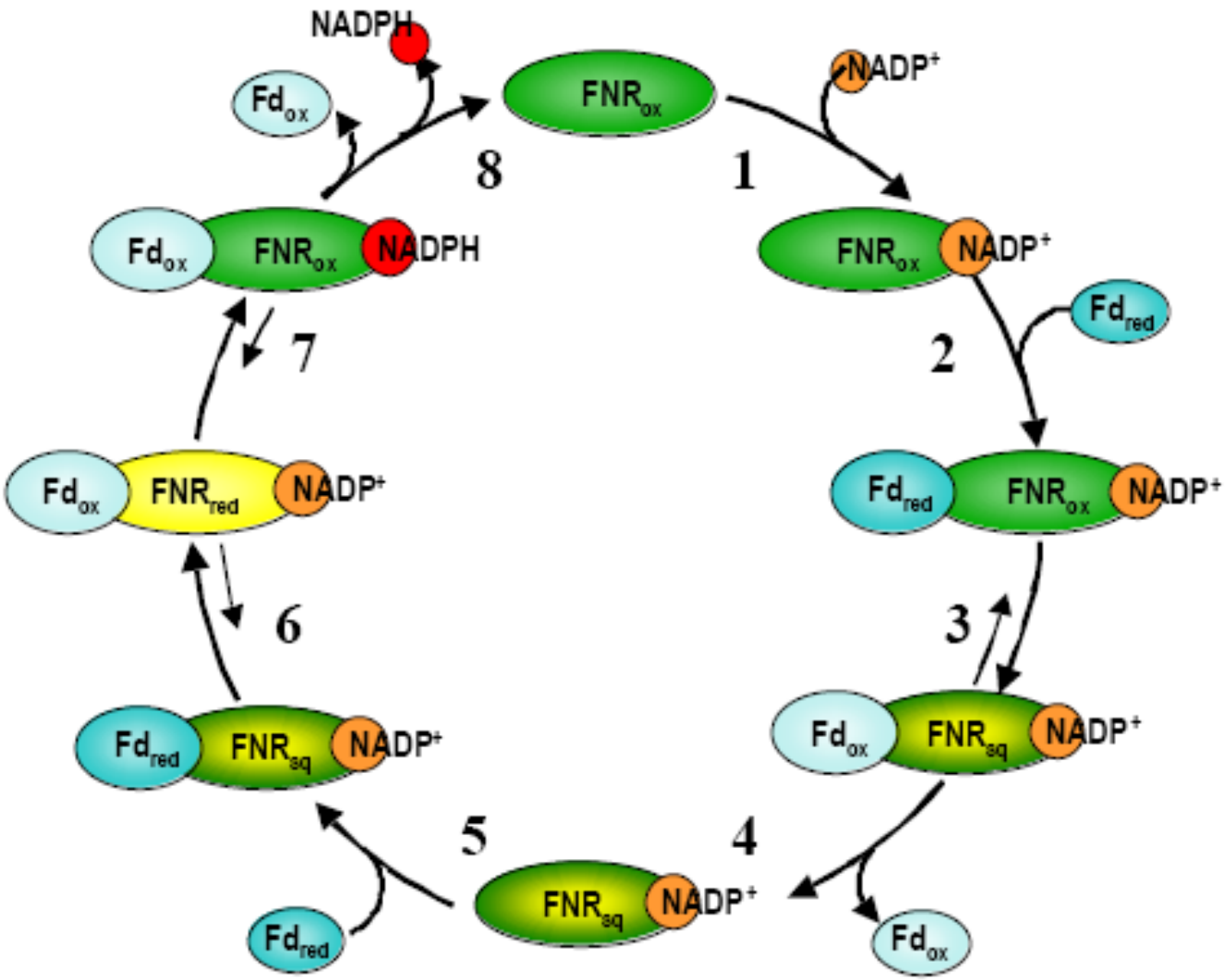
EJEMPLO: EL COMPLEJO FNR-NADP

La enzima “Ferredoxina FADP$^+$ Reductasa”



DIFRACCIÓN DE RAYOS X

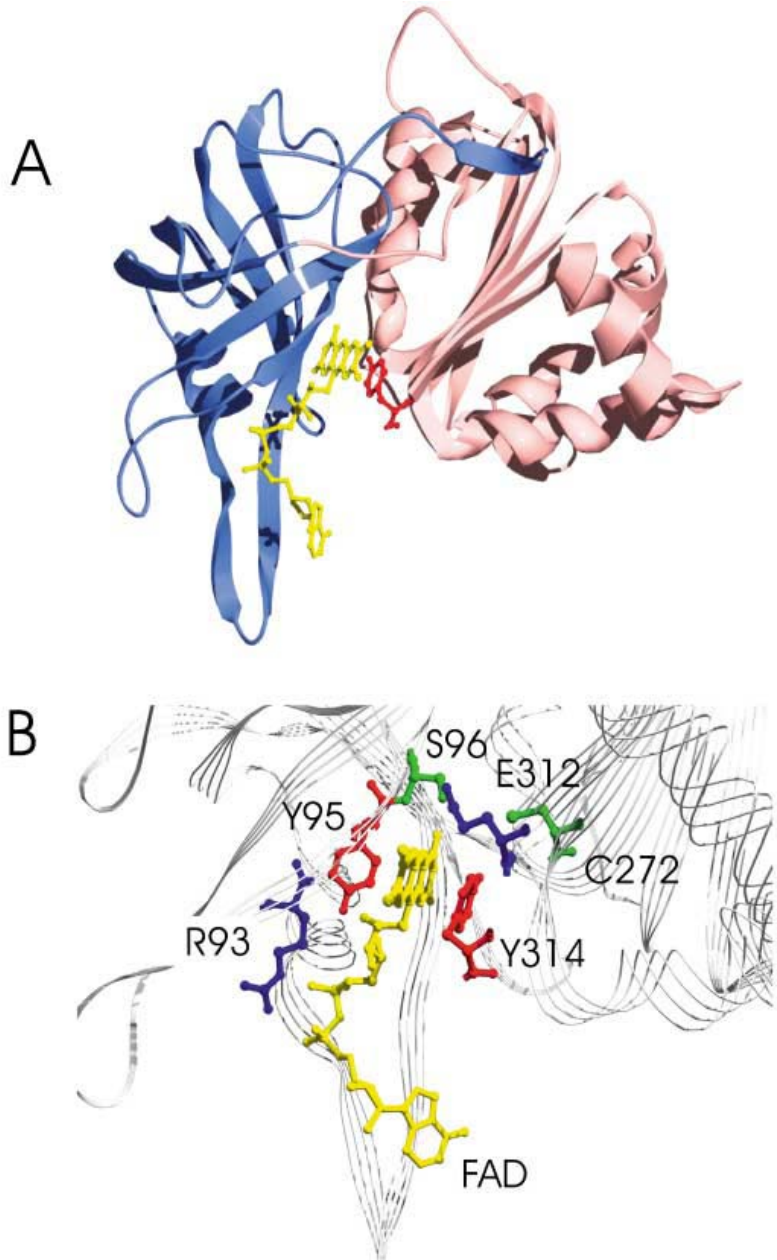
Ciclo catalítico de la FNR:



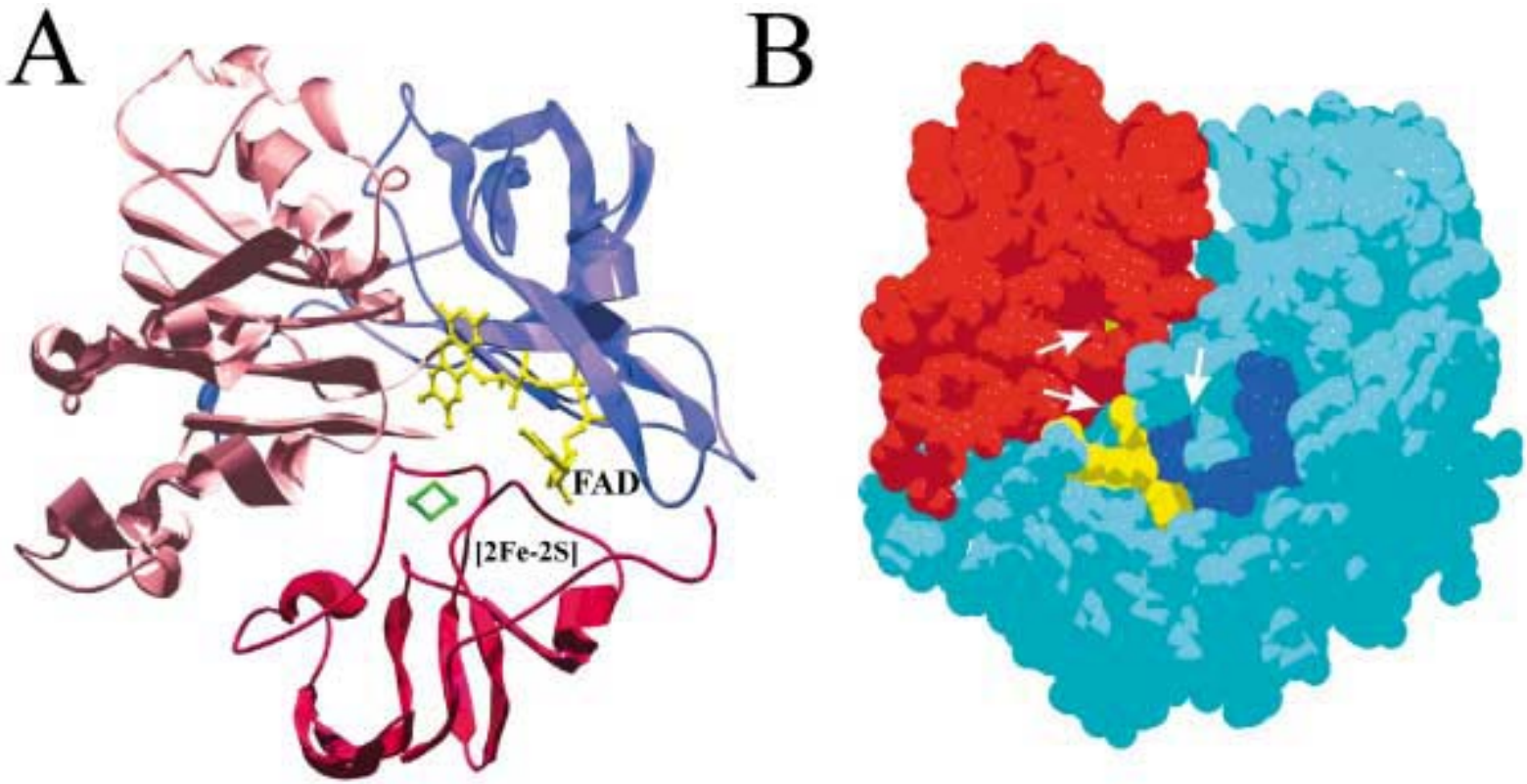
DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Estructura obtenida: representaciones

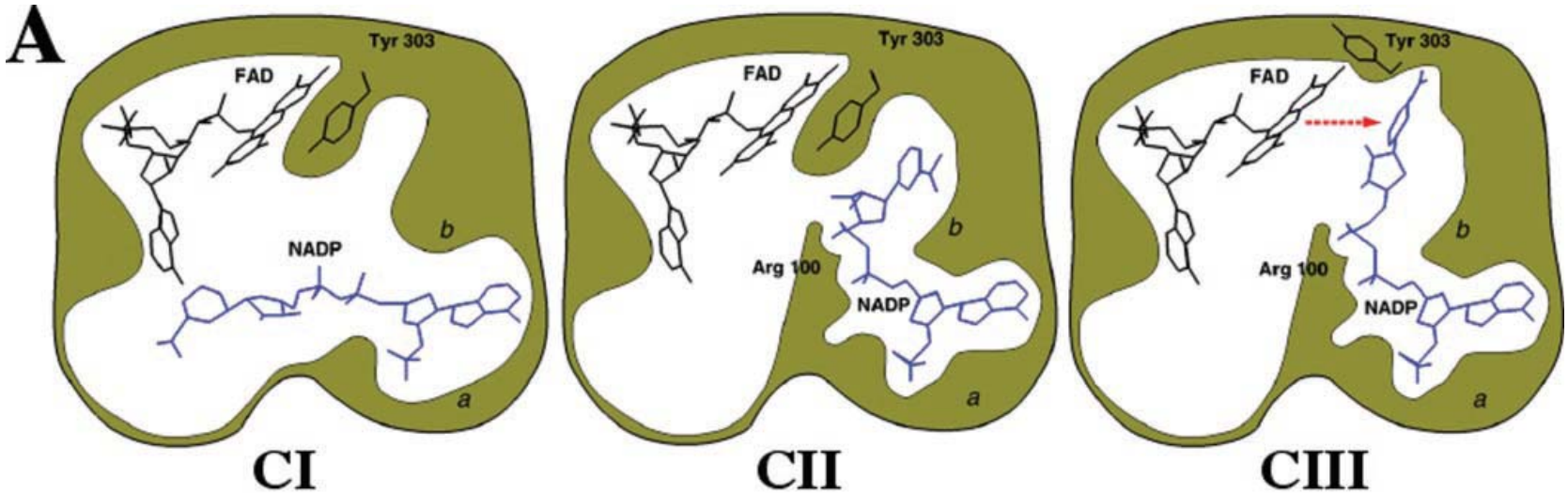
DIFRACCIÓN DE RAYOS X

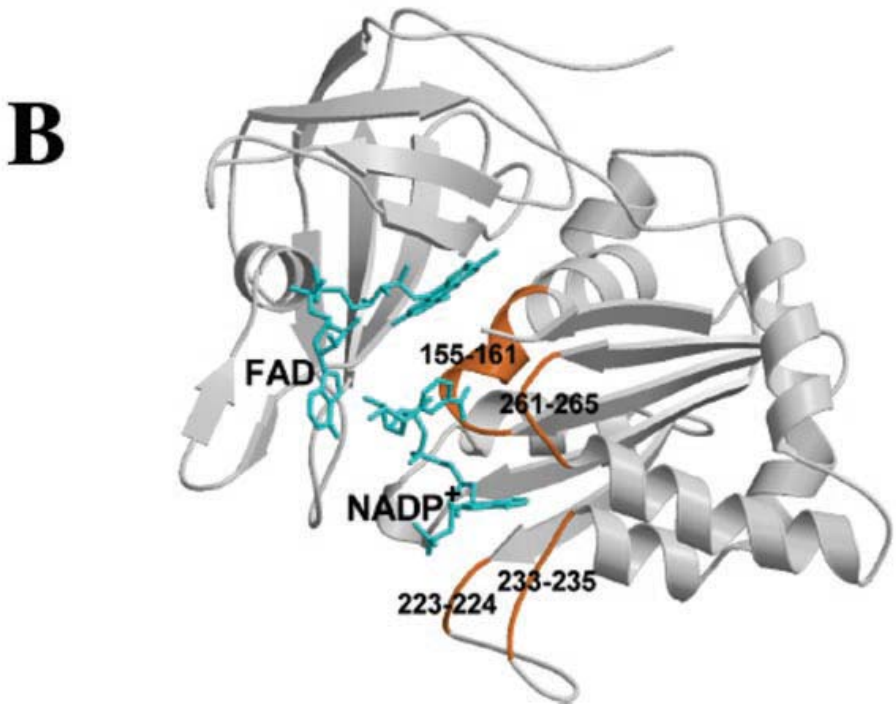


DIFRACCIÓN DE RAYOS X



DIFRACCIÓN DE RAYOS X





USO DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS EN BIOFÍSICA

¿Para qué, la espectroscopia?

- ✓Las estructuras mediante difracción de rayos X son muy útiles, pero...
  - ✓No siempre se dispone de cristales
  - ✓Debate: ¿estructura cristal-estructura disolución?
  - ✓Información sobre la proteína activa
  - ✓Información no contenida en la estructura molecular

- ✓Las espectroscopias suministran métodos de caracterización inicial básica

- ✓Las espectroscopias seguirán suministrando caracterización avanzada que no se puede sustituir mediante estructura por difracción.

USO DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS EN BIOFÍSICA

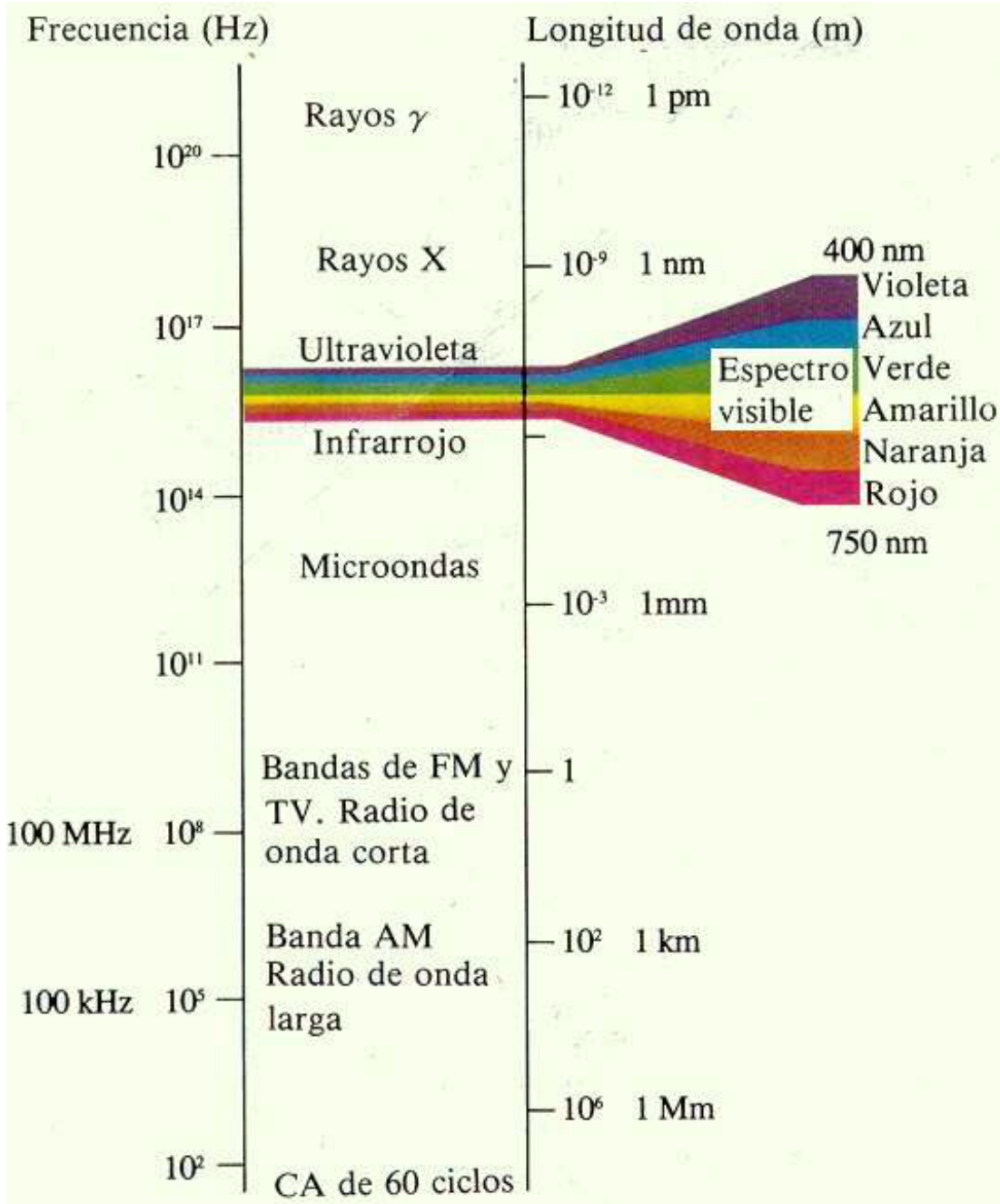
Espectroscopia: estudio de la interacción radiación-materia con resolución espectral

En general, son técnicas inelásticas (absorción, emisión, dispersión inelástica)

Se clasifican por:

- ✓Rango de frecuencias
- ✓Grado de libertad energético del material que se excita

- ✓Espectroscopias ópticas
- ✓NMR
- ✓EPR
- ✓Raman
- ✓Mössbauer
- ✓...


Frecuencia (Hz)
Longitud de onda (m)
Rayos γ
Rayos X
Ultravioleta
Infrarrojo
Microondas
Bandas de FM y TV. Radio de onda corta
Banda AM Radio de onda larga
CA de 60 ciclos
10^20
10^17
10^14
10^11
100 MHz 10^8
100 kHz 10^5
10^2
10^-12 1 pm
10^-9 1 nm
10^-3 1mm
1
10^2 1 km
10^6 1 Mm
400 nm
Violeta
Azul
Verde
Amarillo
Naranja
Rojo
750 nm
Espectro visible

RADIACIÓN EM e INTERACIÓN INELÁSTICA

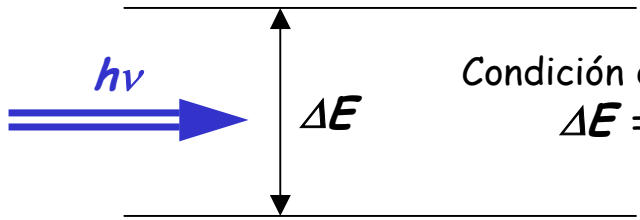
Radiación EM

Longitud de onda: λ
Frecuencia: $\nu = c/\lambda = \omega/(2\pi)$

Energía del fotón: $E = h\nu$

Materia

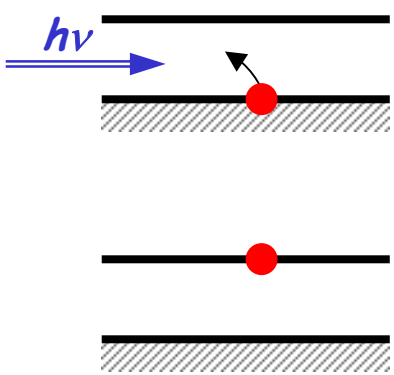
Niveles discretos de energía



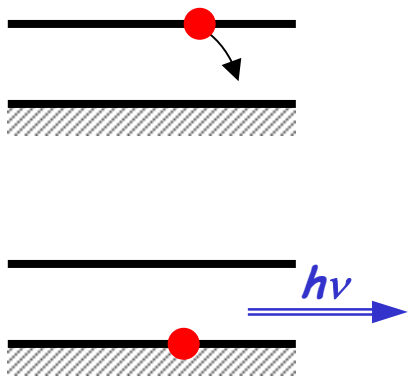
Condición de BOHR
$\Delta E = h\nu$

PROCESOS

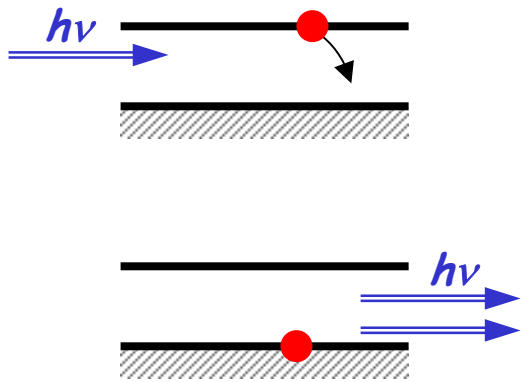
Absorción



Emisión espontánea



Emisión estimulada

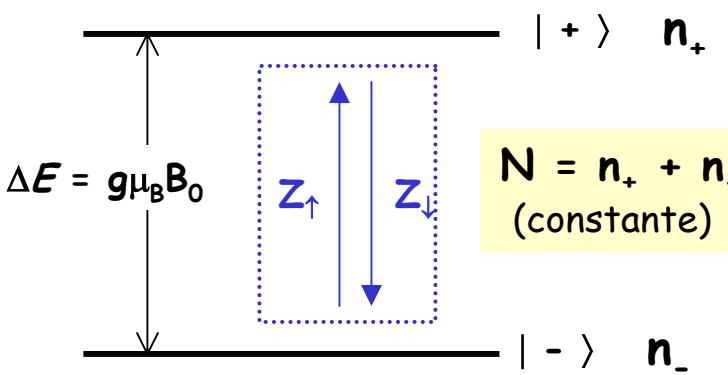


Relaciones de Einstein

$$\frac{P(Emis.\ espon.)}{P(Abs.)} \propto \nu^3 \qquad P(Emis.\ Est.) \propto P(Abs.)$$

INTRODUCIÓN AL FENÓMENO DE LA RESONANCIA (doblete)

Sistema de dos niveles, $|+\rangle$ y $|-\rangle$, separados en energía $\Delta E = g\mu_B B_0$ en presencia de un campo estático B_0.



$N = n_+ + n_-$
(constante)

Estado estacionario

Equilibrio a una temperatura **T**
(Temperatura de espines)

$$\frac{n_+^{ss}}{n_-^{ss}} = exp\left(-\frac{\Delta E}{k_B T}\right)$$

Interacciones con "LA RED" y el CAMPO EM

$$\frac{dn_+}{dt} = -Z_\downarrow n_+ + Z_\uparrow n_-$$

$$\frac{dn_-}{dt} = Z_\downarrow n_+ - Z_\uparrow n_-$$

$$n = n_- - n_+$$

$$\frac{dn}{dt} = \left(Z_\downarrow - Z_\uparrow\right)N - \left(Z_\downarrow + Z_\uparrow\right)n$$

$$\boxed{\frac{dn}{dt} = -\frac{n - n^{ss}}{\tau_1}}$$

$$n^{ss} = n_-^{ss} - n_+^{ss} = \frac{Z_\downarrow - Z_\uparrow}{Z_\downarrow + Z_\uparrow} N$$

equilibrio

$$\frac{1}{\tau_1} = Z_\downarrow + Z_\uparrow$$

TIEMPO DE RELAJACIÓN

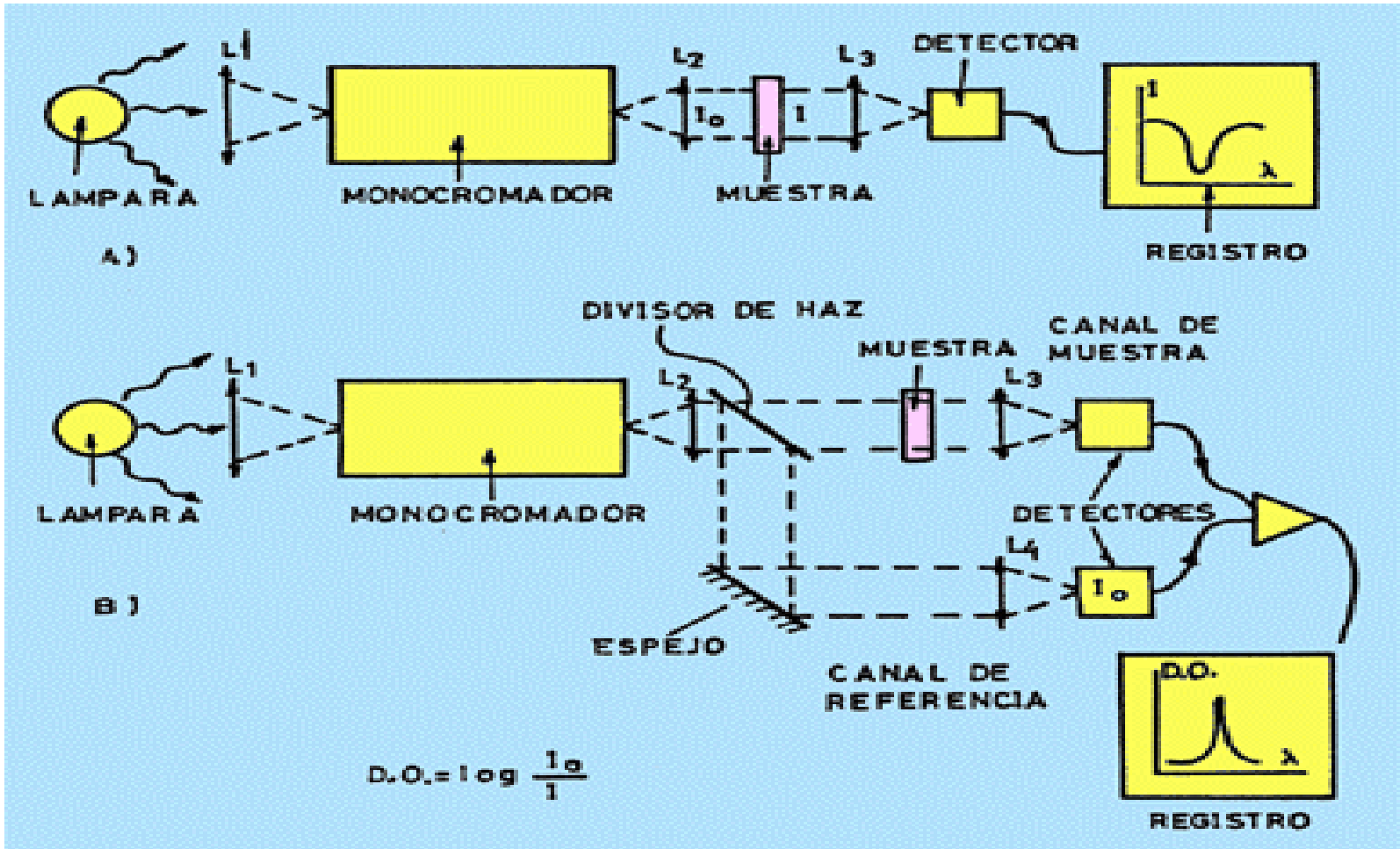
USO DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS EN BIOFÍSICA

¿De qué color son las proteínas?

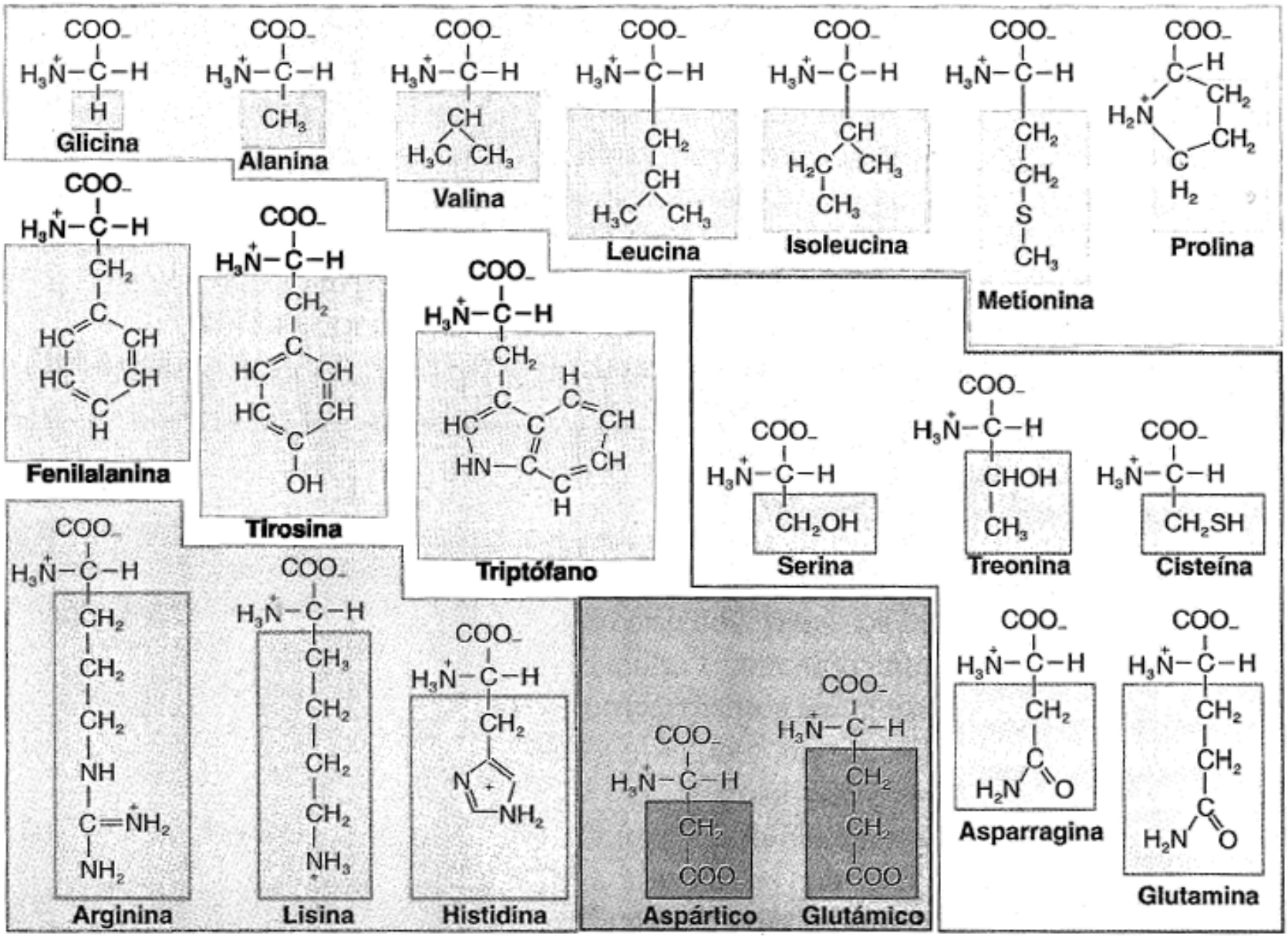
- ✓ Espectrofotometría de absorción
  - * IR
  - * Visible
  - * UV
- ✓ Espectrofotometría de emisión
- ✓ Dicroísmo Circular

ESPECTROSCOPIA ÓPTICA

Esquema de un espectrofotómetro de un solo haz y de doble haz

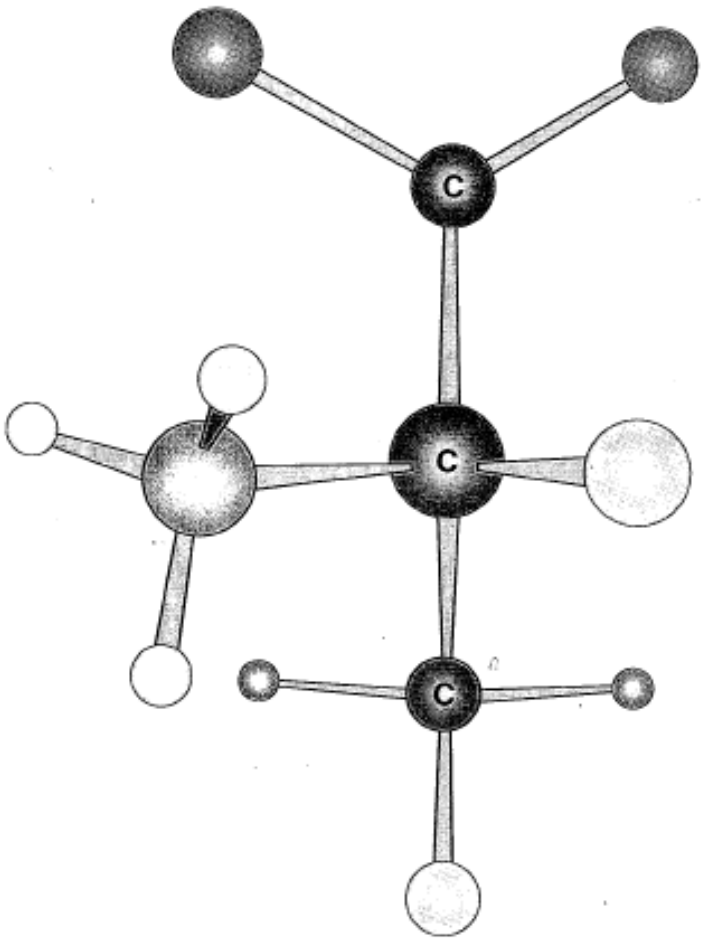


ESPECTROSCOPIA ÓPTICA

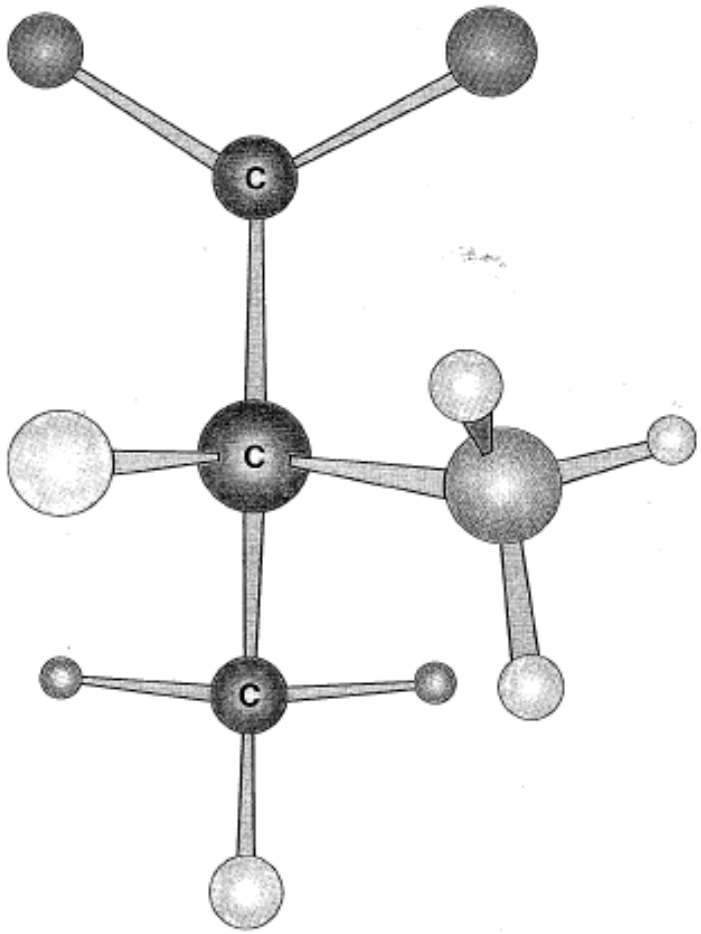


ESPECTROSCOPIA ÓPTICA

Isomería óptica de aminoácidos



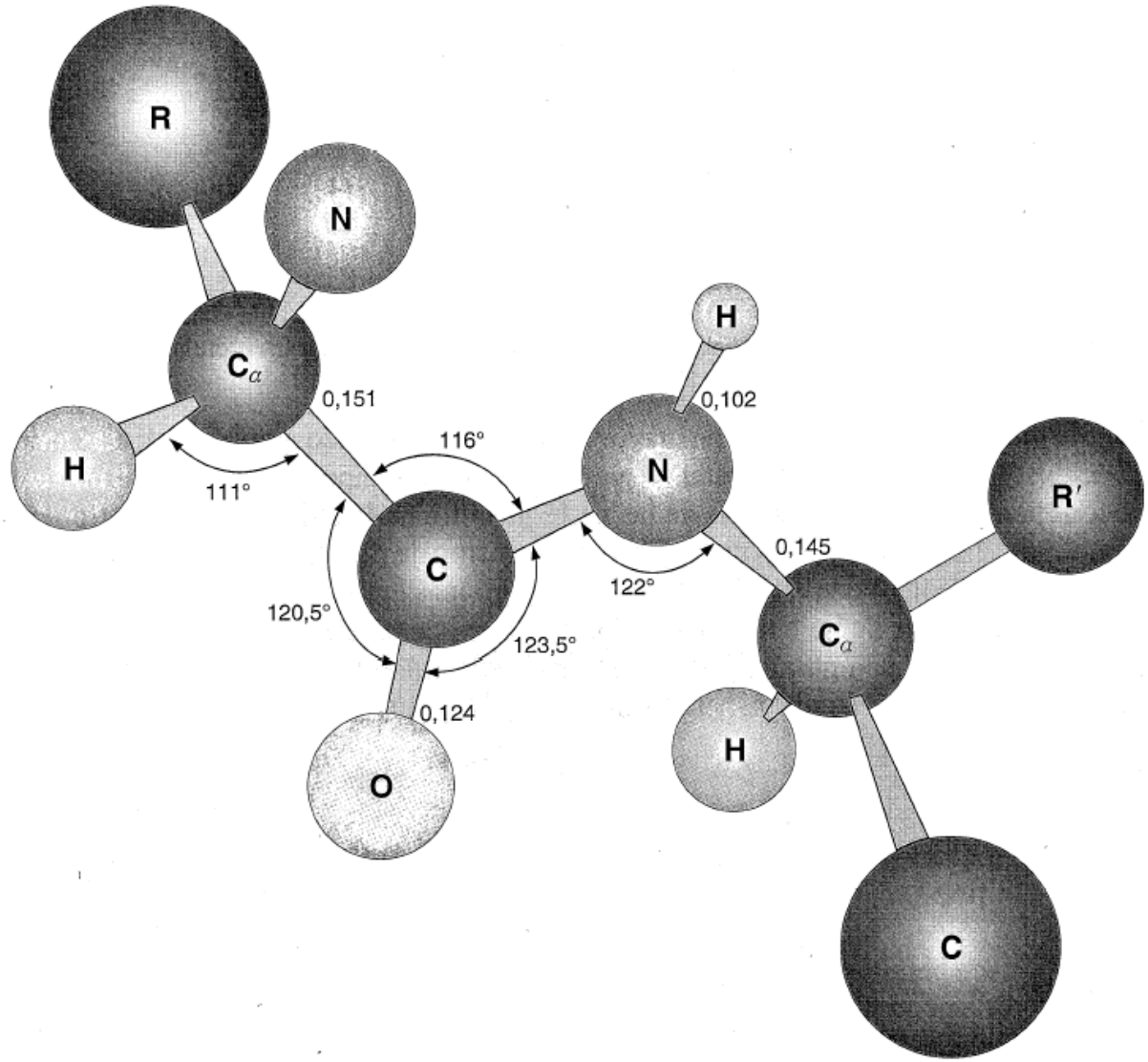
L-alanina



D-alanina

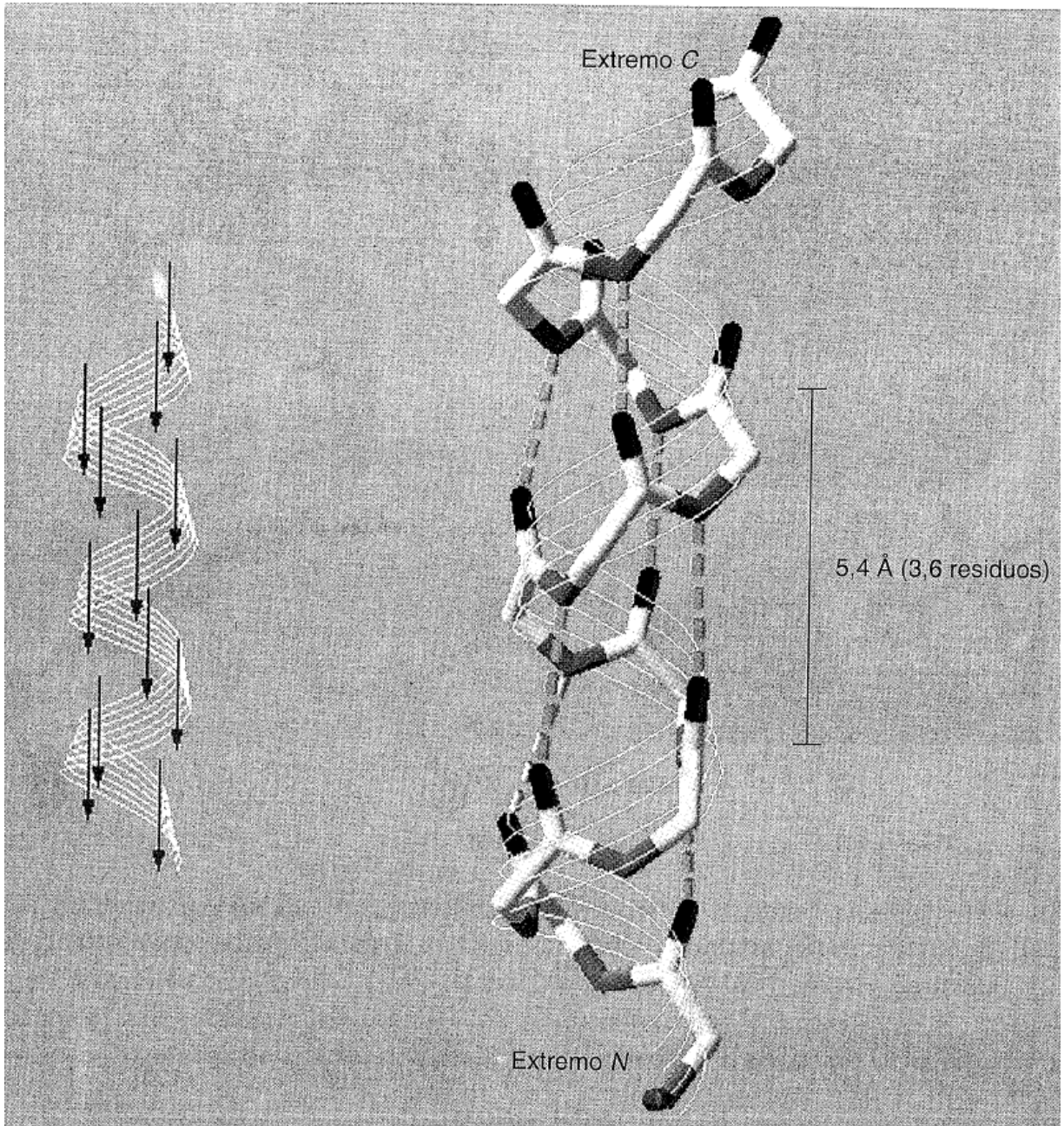
ESPECTROSCOPIA ÓPTICA

El enlace peptídico



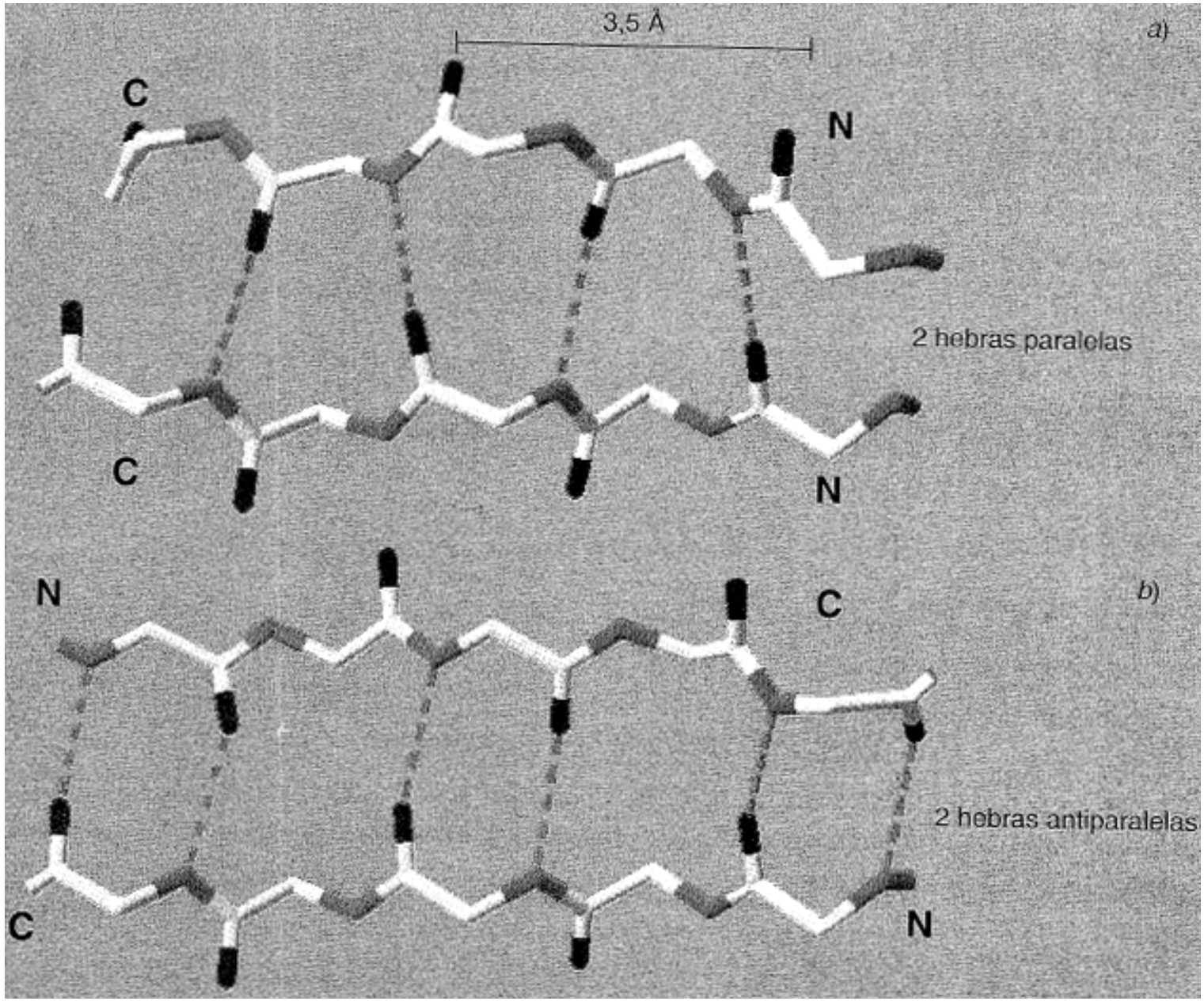
ESPECTROSCOPIA ÓPTICA

Estructura de hélice α



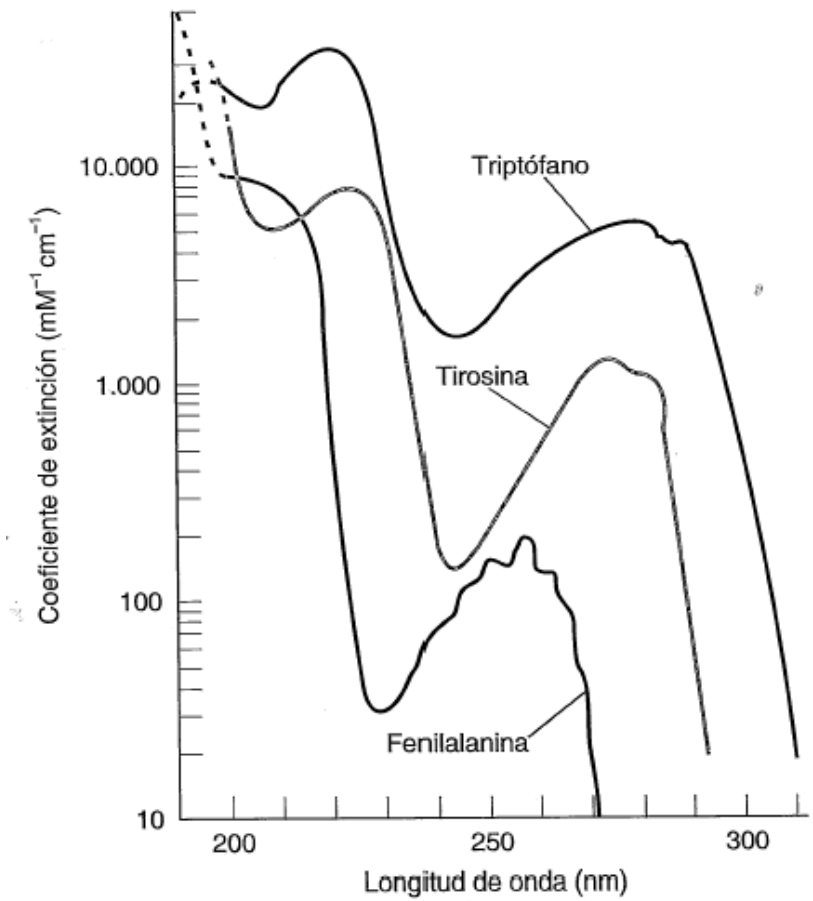
ESPECTROSCOPIA ÓPTICA

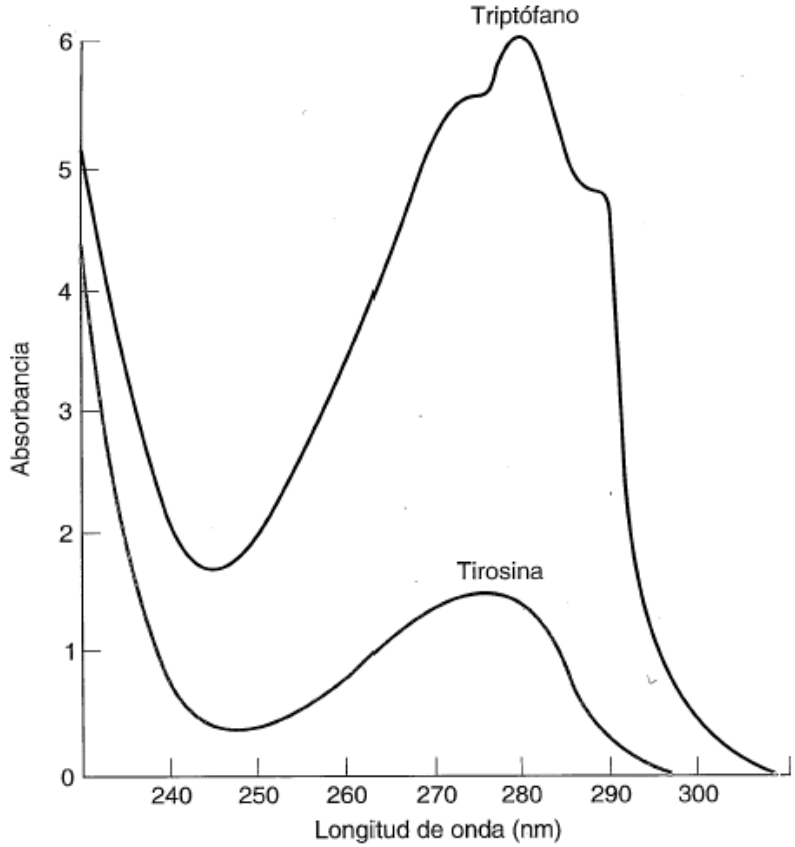
Estructura de lámina β



ESPECTROSCOPIA ÓPTICA

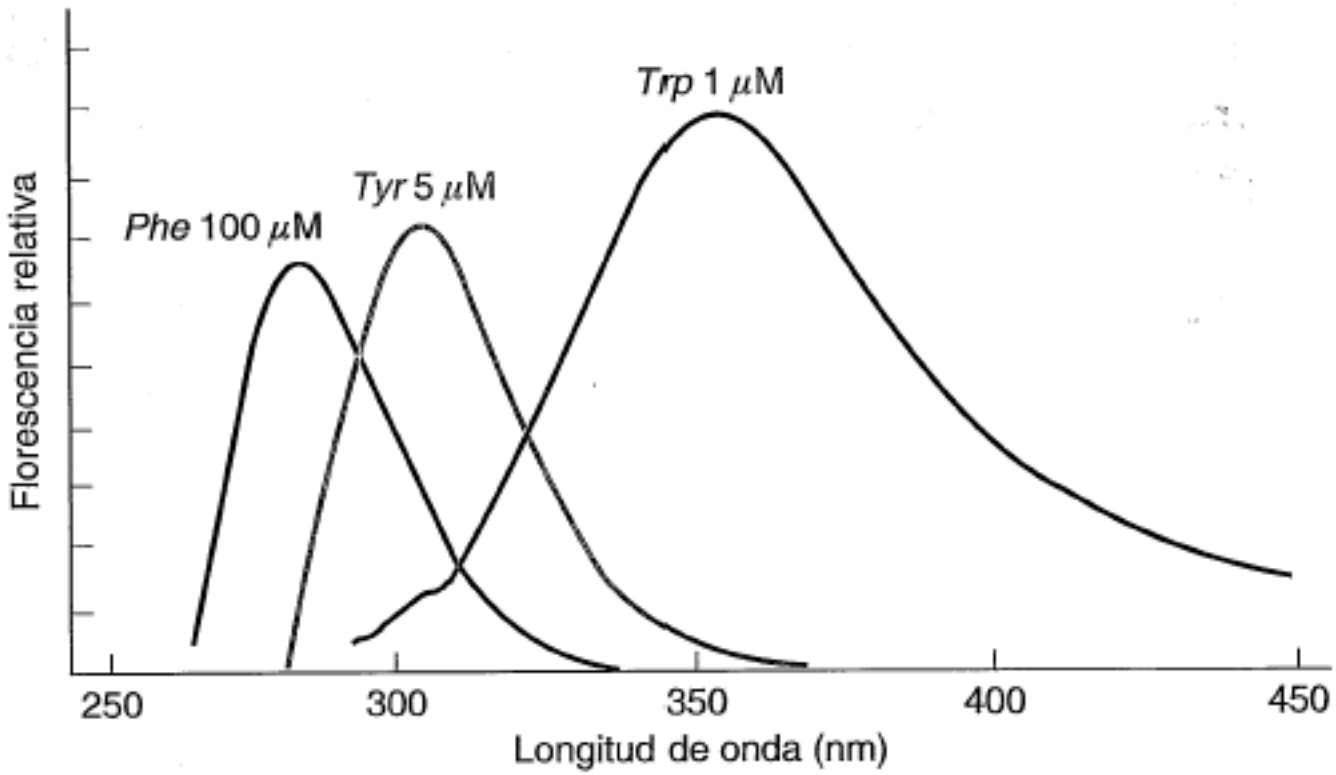
Absorbancia visible-UV:
Caracterización de aminoácidos





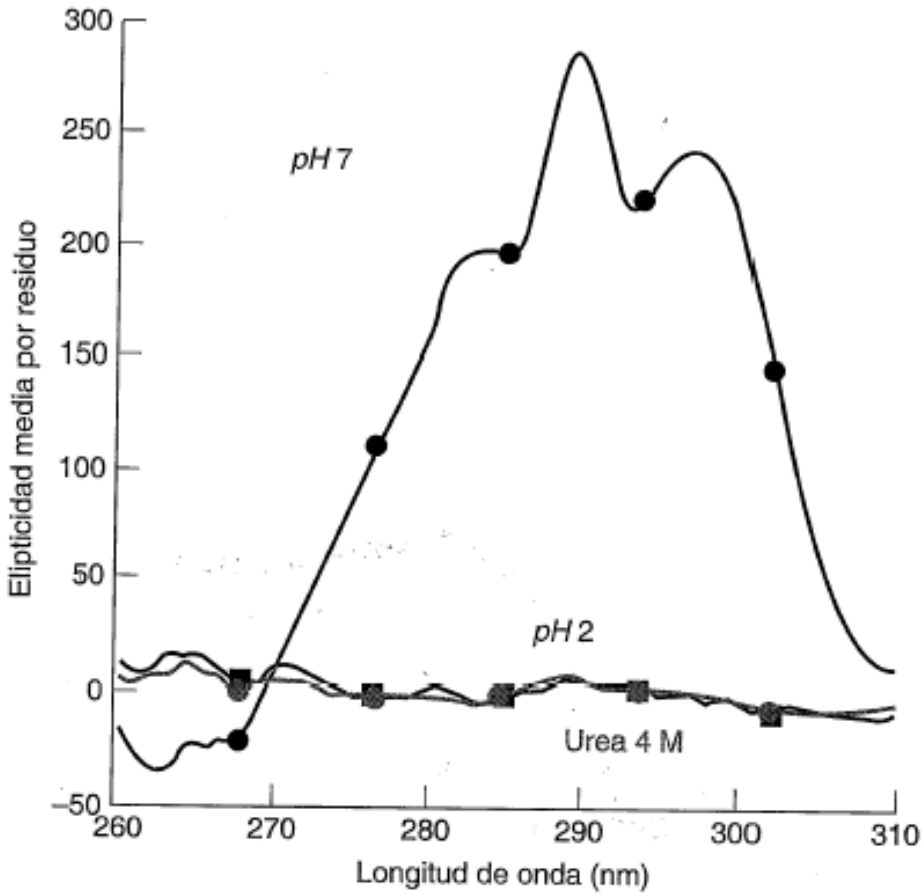
ESPECTROSCOPIA ÓPTICA

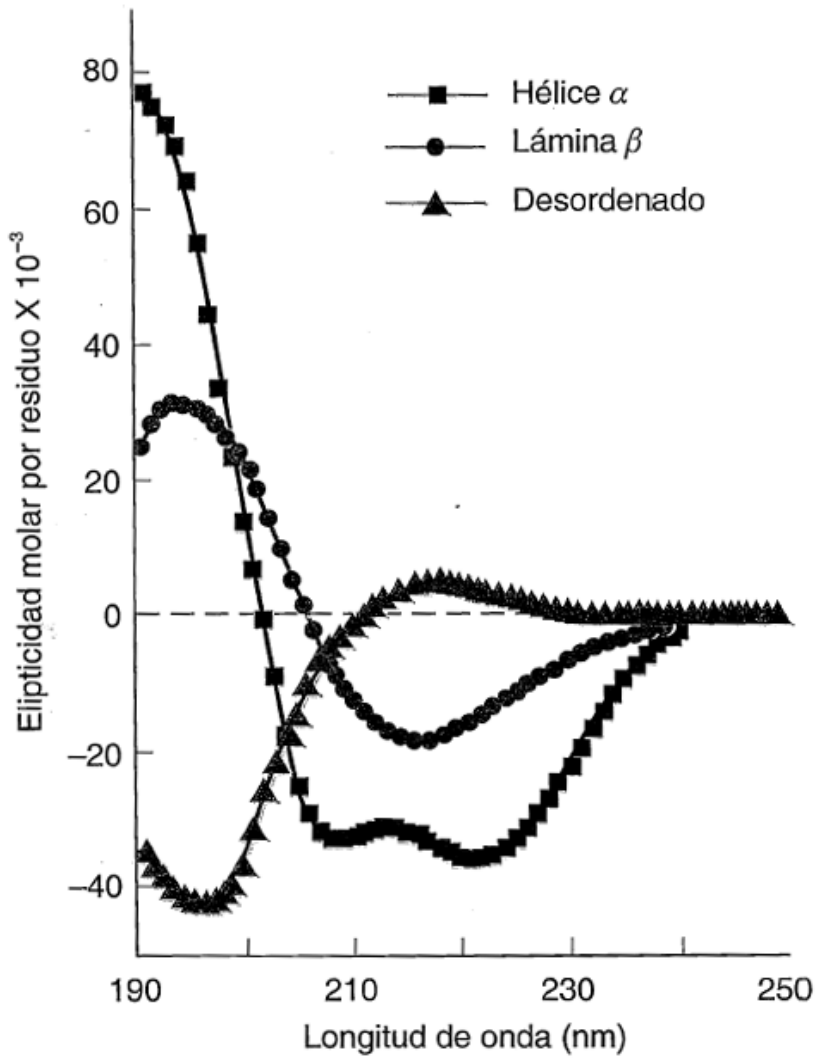
Fluorescencia de aminoácidos aromáticos



ESPECTROSCOPIA ÓPTICA

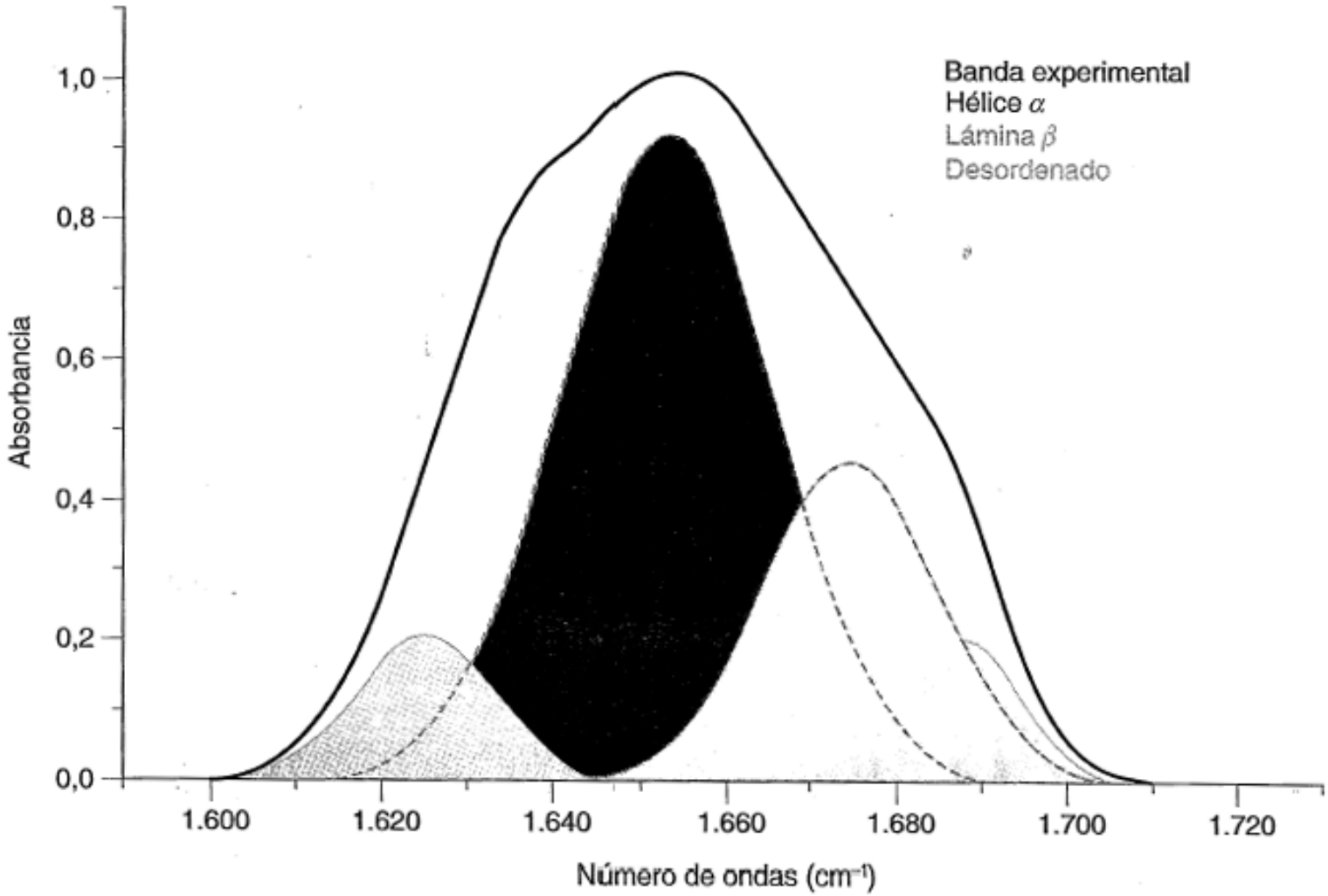
Estructura secundaria revelada mediante dicroísmo circular en el UV





ESPECTROSCOPIA ÓPTICA

Estructura secundaria revelada
mediante absorción de infrarrojos

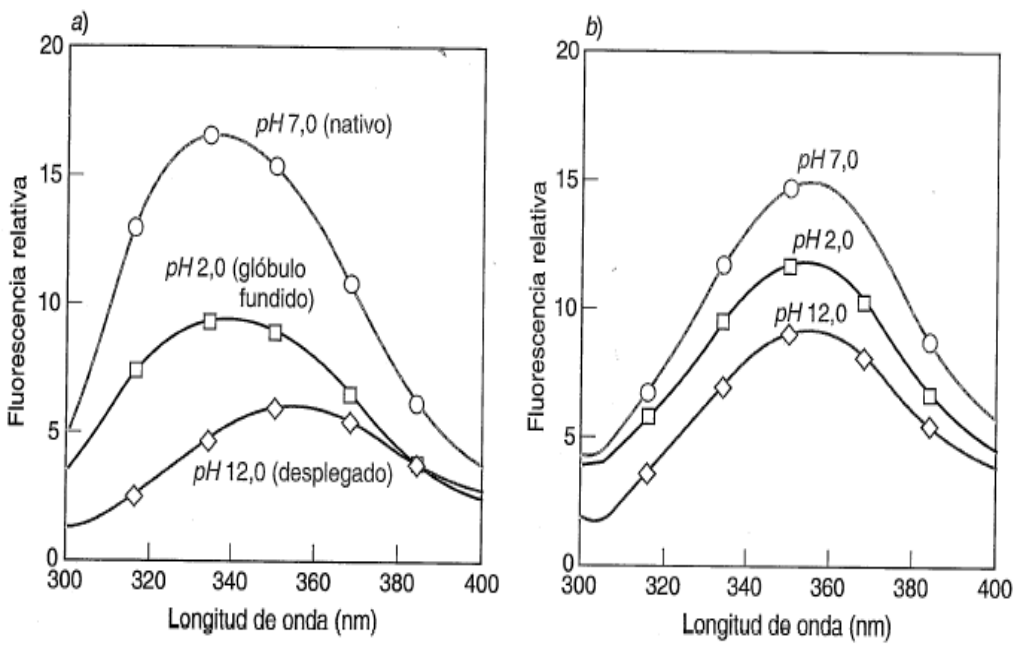


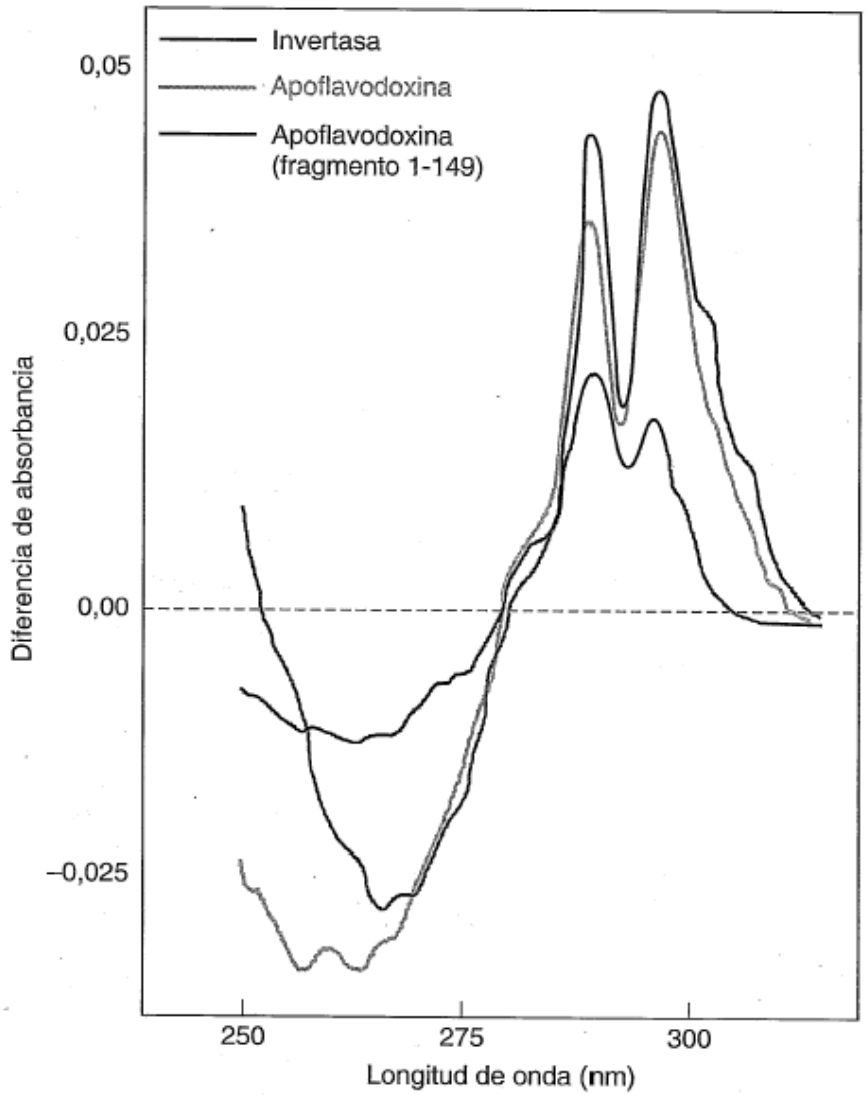
ESPECTROSCOPIA ÓPTICA

Espectro diferencial UV

Detección de la compacidad de plegamiento

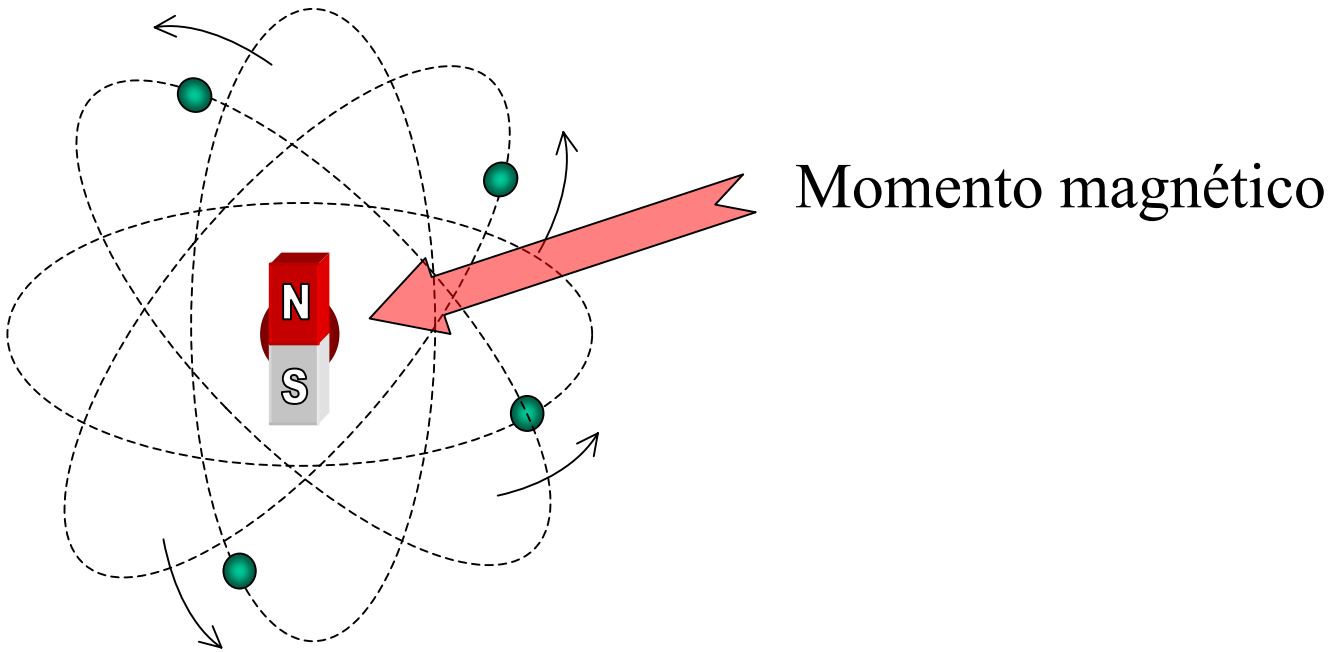
Espectro de fluorescencia



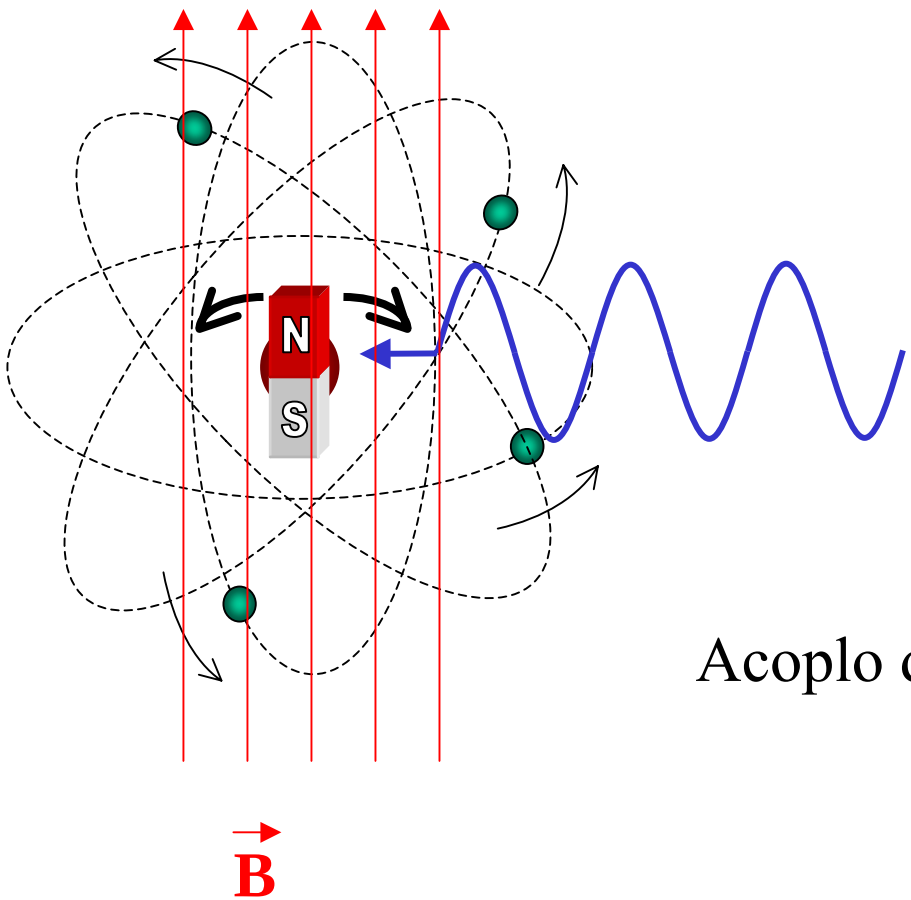


FUNDAMENTOS DE LA RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Modelo “naïve”



FUNDAMENTOS DE LA RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

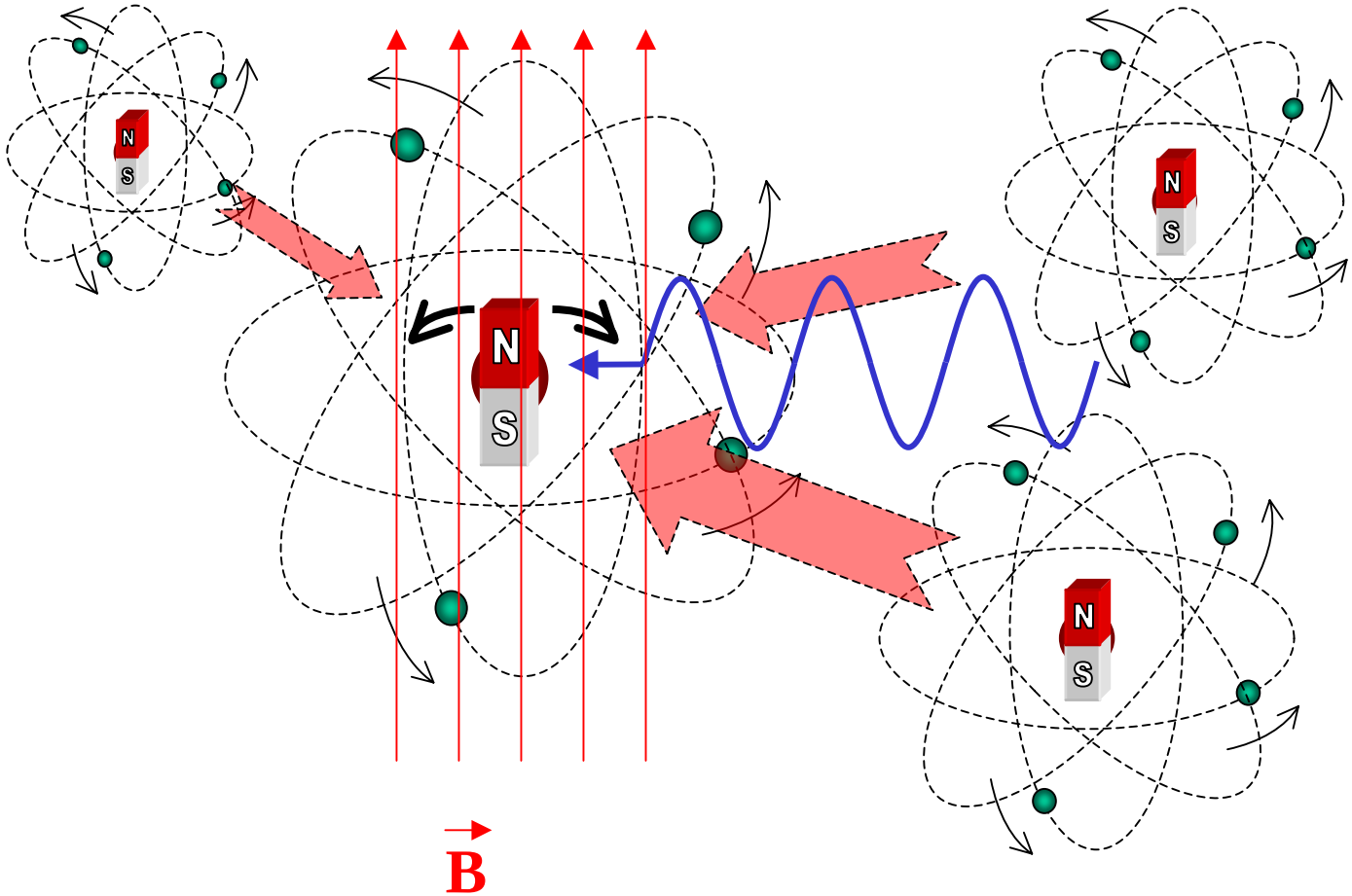


Ondas de radio

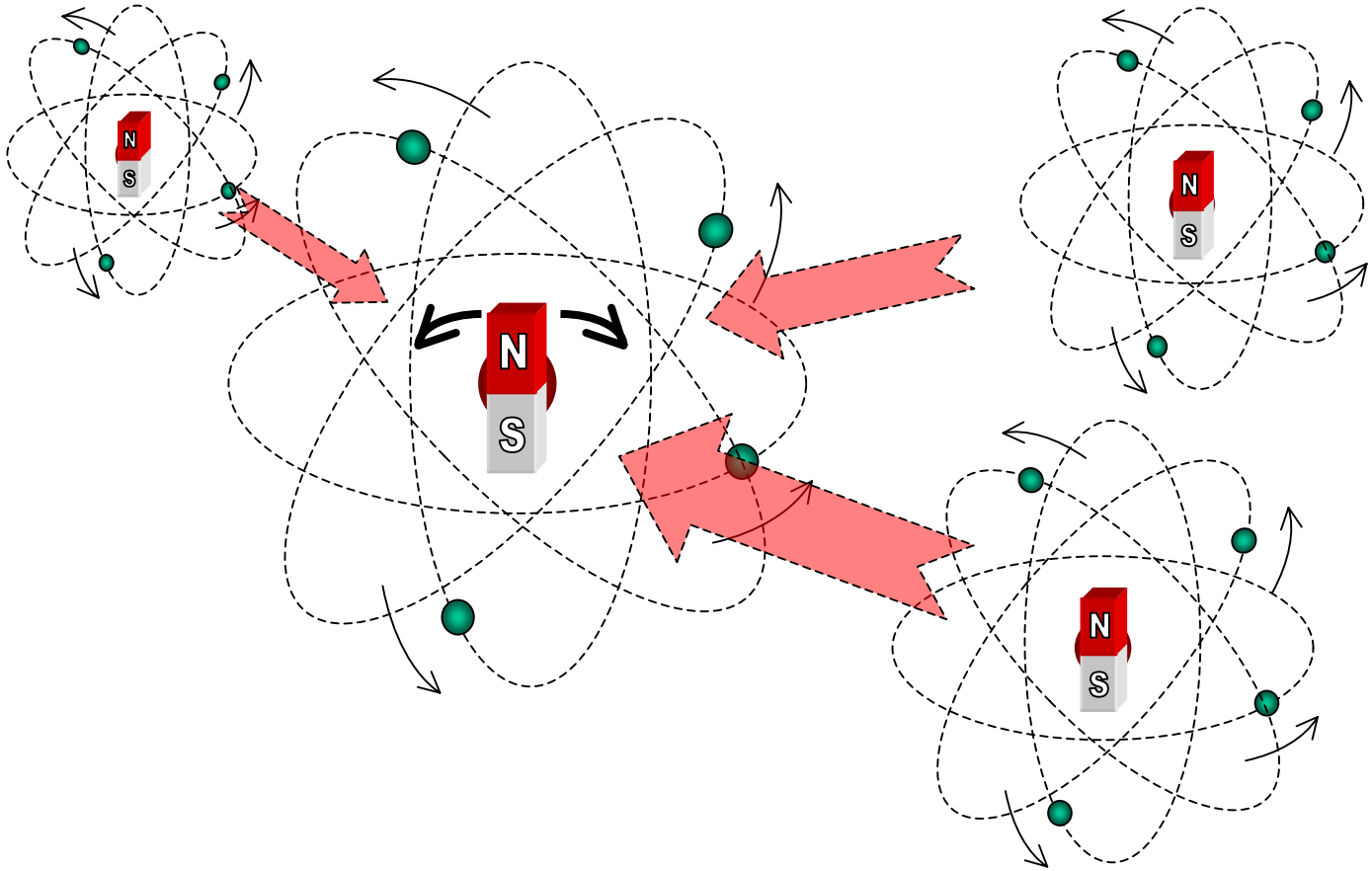
Acoplo de la oscilación

Detección de la frecuencia de giro

FUNDAMENTOS DE LA RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR



FUNDAMENTOS DE LA RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR



La interacción entre núcleos modifica la frecuencia de giro ⇒ INFORMACIÓN ESTRUCTURAL

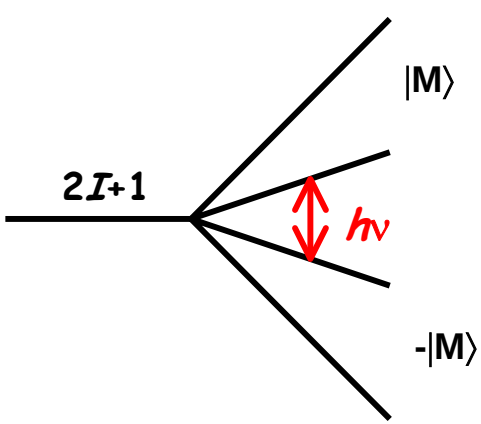
FUNDAMENTOS DE LA RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

✓Los núcleos de algunos isótopos presentan degeneración de espín

✓Al aplicar un campo magnético, la degeneración se resuelve, efecto Zeeman (nuclear)

$$H = \mu_N g_N \vec{B}_0 \cdot \vec{I} = \mu_N g_N B_0 I_z$$

$$E(M) = E_0 - \mu_N g_N B_0 M$$



Transiciones dipolares magnéticas $|\Delta M| = \pm 1$

Resonancia $h\nu = \mu_N g_N B_0$

De acuerdo con $h\nu = \mu_N g_N B_0$ la resonancia se puede obtener experimentalmente variando la frecuencia, ν, o el campo estático, B_0.

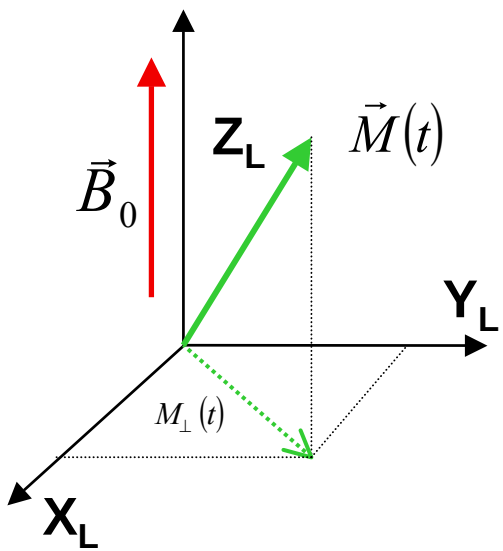
534 FUNDAMENTAL CONSTANTS, CONVERSION FACTORS AND KEY DATA

TABLE G.4 Properties of Selected Nuclides/Atoms

Z	Nuclide[a]	Natural Abundance[a] (%)	Spin	g_n[b]	$\frac{g_n\beta_n}{g_e\beta_e} \times 10^5$
1	^{1}H	99.9850	1/2	5.5856948	151.92704
	^{2}H	0.0148	1	0.8574388	23.32174
2	^{3}He	0.000138	1/2	−4.255280	−115.7407
3	^{6}Li	7.5	1	0.8220575	22.35940
	^{7}Li	92.5	3/2	2.170977	59.04908
4	^{9}Be	100	3/2	−0.7850	−21.352
5	^{10}B	19.8	3	0.600220	16.32557
	^{11}B	80.2	3/2	1.792437	48.75306
6	^{13}C	1.11	1/2	1.40483	38.2104
7	^{14}N	99.63	1	0.4037637	10.98209
	^{15}N	0.366	1/2	−0.5663826	−15.40522
8	^{17}O	0.038	5/2	−0.757522	−20.60406
9	^{19}F	100	1/2	5.257771	143.0077
10	^{21}Ne	0.27	3/2	−0.441200	−12.00034
11	^{23}Na	100	3/2	1.478402	40.21151
12	^{25}Mg	10.00	5/2	−0.34218	−9.30713
13	^{27}Al	100	5/2	1.456612	39.61883
14	^{29}Si	4.67	1/2	−1.1106	−30.20778
15	^{31}P	100	1/2	2.26322	61.55793
16	^{33}S	0.75	3/2	0.42911	11.67158
17	^{35}Cl	75.77	3/2	0.5479198	14.90304
	^{37}Cl	24.23	3/2	0.4560854	12.40521
19	^{39}K	93.26	3/2	0.2609928	7.09882
	^{41}K	6.73	3/2	0.1432553	3.89644
20	^{43}Ca	0.135	7/2	−0.376417	−10.23828
21	^{45}Sc	100	7/2	1.35962	36.9807
22	^{47}Ti	7.4	5/2	−0.31539	−8.5784
	^{49}Ti	5.4	7/2	−0.315468	−8.58051
23	^{50}V	0.250	6	0.556597	15.13906
	^{51}V	99.750	7/2	1.46837	39.9387
24	^{53}Cr	9.50	3/2	−0.3147	−8.560
25	^{55}Mn	100	5/2	1.3819	37.587
26	^{57}Fe	2.15	1/2	0.1806	4.912
27	^{59}Co	100	7/2	1.318	35.849
28	^{61}Ni	1.13	3/2	−0.50001	−13.6000
29	^{63}Cu	69.2	3/2	1.484	40.36
	^{65}Cu	30.8	3/2	1.588	43.19
30	^{67}Zn	4.10	5/2	0.350315	9.52831
31	^{69}Ga	60.1	3/2	1.34440	36.5668
	^{71}Ga	39.9	3/2	1.70819	46.4616
32	^{73}Ge	7.8	9/2	−0.1954371	−5.315654
33	^{75}As	100	3/2	0.959654	26.10193
34	^{77}Se	7.6	1/2	1.0693	29.084
35	^{79}Br	50.69	3/2	1.404276	38.19535

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Evolución de la magnetización bajo campo estático



$$\vec{B}_0 = B_0 \hat{k}$$

$$\gamma = \mu_N \, g_N$$

$$\vec{M} = \langle \vec{I} \rangle$$

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = -\gamma \, \vec{M} \wedge \vec{B}_o$$

$$\frac{dM_x}{dt} = \omega_L \, BM_y$$

$$\frac{dM_y}{dt} = -\omega_L \, BM_x$$

$$\frac{dM_z}{dt} = 0$$

$$\omega_L = \gamma \, B_o \Longleftarrow$$

Frecuencia de Larmor
(propia de cada núcleo)

$$M_x(t) = M_\perp(0) \cos(\omega_L t)$$

$$M_y(t) = M_\perp(0) \sin(\omega_L t)$$

$$M_z(t) = M_z(0)$$

La magnetización realiza una precesión en torno al campo magnético estático

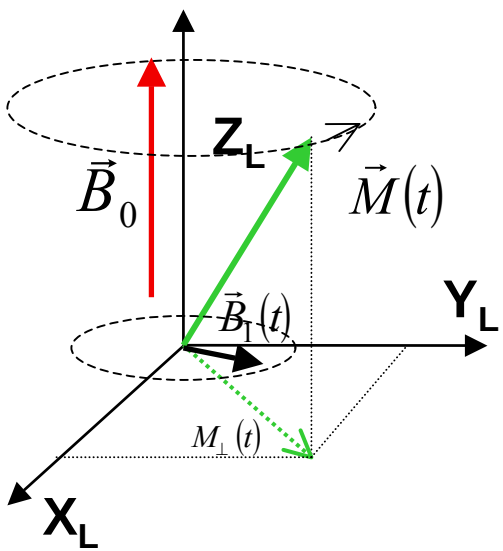
RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

$$M_x(t) = e^{-t/T_2} M_\perp(0)\cos(\omega_L t)$$
$$M_y(t) = e^{-t/T_2} M_\perp(0)\sin(\omega_L t)$$
$$M_z(t) = M_z^{eq} - e^{-t/T_1}\left[M_z^{eq} - M_z(0)\right]$$

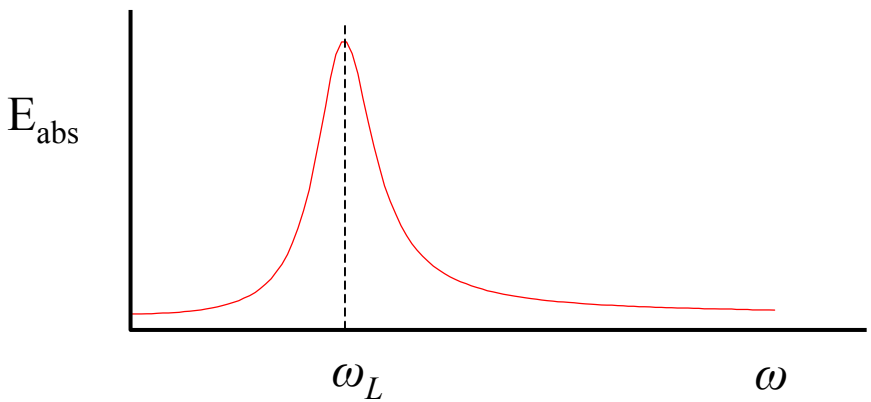
La precesión de la magnetización relaja al estado de equilibrio a través de la interacción con los modos de energía de la red

Microondas: introducen un campo transversal, débil y variable

$$\vec{B}_1(t) = B_1\left[\cos(\varpi\, t)\,\vec{i} + sen(\varpi\, t)\,\vec{j}\right]$$



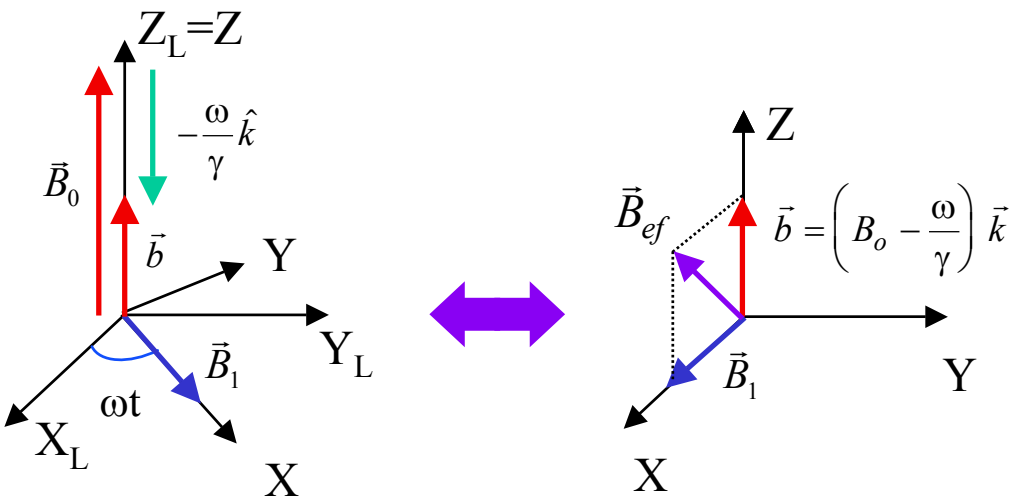
Cuando $\omega = \omega_L$, el campo de microondas se acopla a la magnetización, y se produce absorción de energía (resonancia)



DESCRIPCIÓN EN COORDENADAS ROTATORIAS

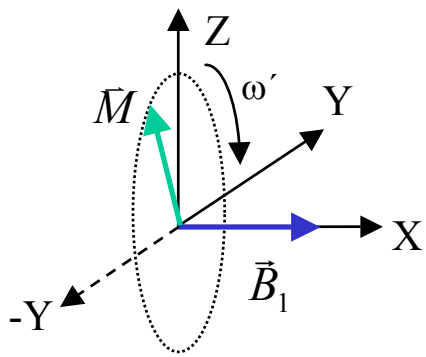
(ejes rotando en torno a Z con una frecuencia ω)

El comportamiento de $\vec{M}$ se describe con las mismas ecuaciones, considerando un campo efectivo $\vec{B}_{ef} = \vec{B} - \omega\gamma^{-1}\vec{k}$.



resonancia

- ✓ Para $\omega = \omega_L, \vec{b} = 0$: la magnetización precede en el plano Z-Y, pasando a estados de energía más alta



Descripción cuántica de la magnetización

$$M_i = \langle I_i \rangle = tr(I_i\,\rho) = \sum_{m_i} \langle m_i | I_i\,\rho | m_i \rangle = \sum_{m_i}\sum_{m'_i} \langle m_i | I_i | m'_i \rangle\, \rho_{m'_i m_i}$$

Caso puro: el sistema contiene un conjunto de espines nucleares iguales

MATRIZ DENSIDAD:
sistema I = 1/2 (base de estados de I_z)

$$\rho = \begin{array}{c|cc} & \alpha\ |+1/2\rangle & \beta\ |-1/2\rangle \\ \hline \alpha\ |+1/2\rangle & \mathbf{a} & \mathbf{c^*} \\ \beta\ |-1/2\rangle & \mathbf{c} & \mathbf{b} \end{array}$$

Elementos diagonales
(POBLACIONES)

- **En el equilibrio** $a_o = -b_0 \neq 0$
- **Evolución temporal**

$$a(t) = a_o - \left(a_o - a(0)\right) e^{-t/T_1}$$
$$b(t) = b_o - \left(b_o - b(0)\right) e^{-t/T_1}$$

Elementos no diagonales
(COHERENCIAS)

- **En el equilibrio** $c = 0$
- **Evolución temporal**

$$c(t) = c(0)\, e^{-i\frac{E_j - E_i}{2\pi h}t}\, e^{-t/T_2}$$

Descripción cuántica de la magnetización

Muestra inhomogénea: existen N distintos subsistemas (de espines) independientes

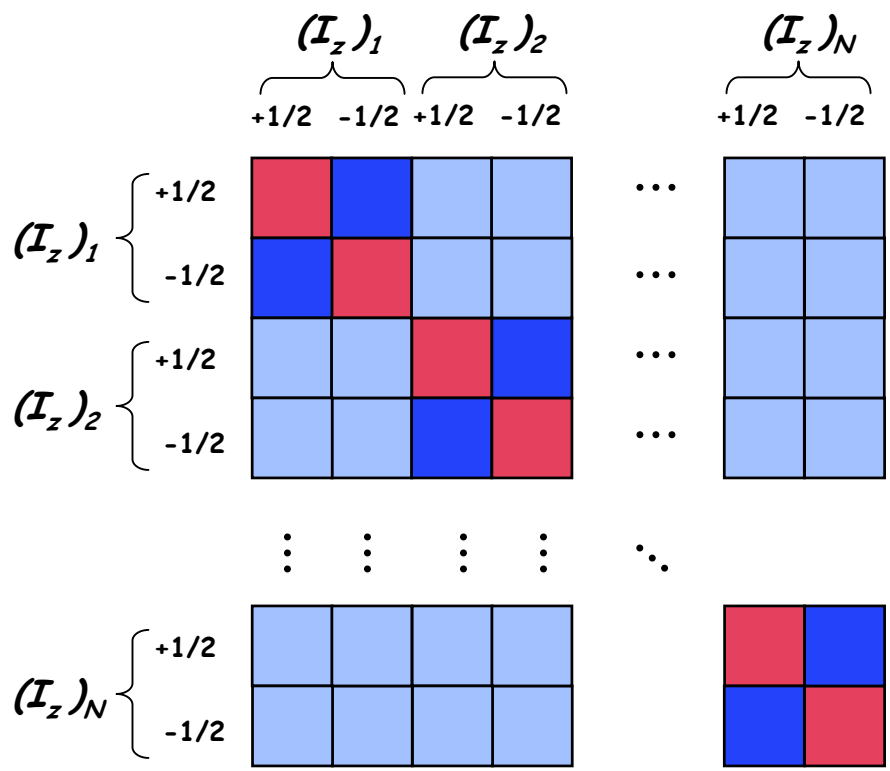
$$\rho = \sum_{n}^{N} \rho_n \Rightarrow M_i = \sum_{n}^{N} tr\left[\left(I_i\right)_n \rho_n\right]$$

Si los sistemas no son independientes, se describen en el espacio $\otimes(I_z)_n$

$$M_i = tr\left(I_i\ \rho\right) = \sum_{m_1,m_2,\ldots,m_N} \sum_{m'_1,m'_2,\ldots,m'_N} \left\langle m_1,m_2,\ldots,m_N \middle| \otimes I_i \middle| m'_1,m'_2,\ldots,m'_N \right\rangle \rho_{(m'_1,m'_2,\ldots,m'_N)(m_1,m_2,\ldots,m_N)}$$

Caso I = 1/2:

ρ =

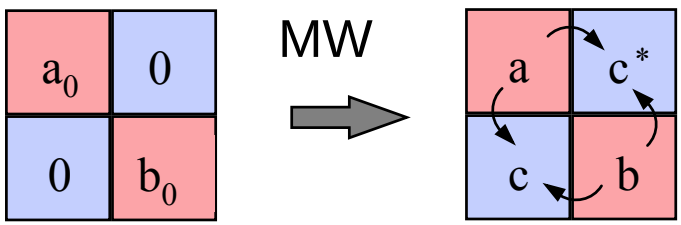


Descripción cuántica de la magnetización

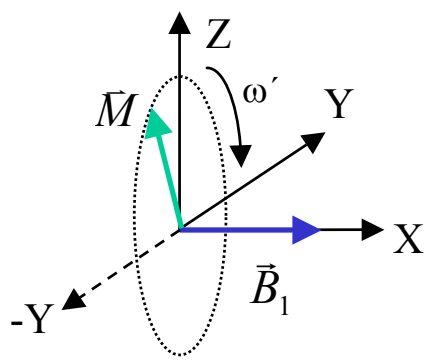
✓Efecto de las microondas: en la resonancia, se reducen los elementos diagonales y se aumentan los no diagonales (transferencia de poblaciones a coherencias) con absorción de energía

RESONANCIA

Descripción cuántica



Magnetización



La magnetización transversal depende de los elementos no diagonales de ρ

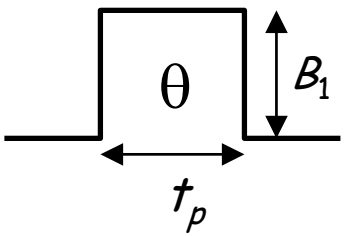
$$M_y = \langle I_y \rangle = tr(I_y\,\rho) = \sum_{m_i}\sum_{m'_i} \langle m_i | I_y | m'_i \rangle\, \rho_{m'_i m_i} \qquad \langle m_i | I_y | m'_i \rangle \neq 0 \Leftrightarrow m_i \neq m'_i$$

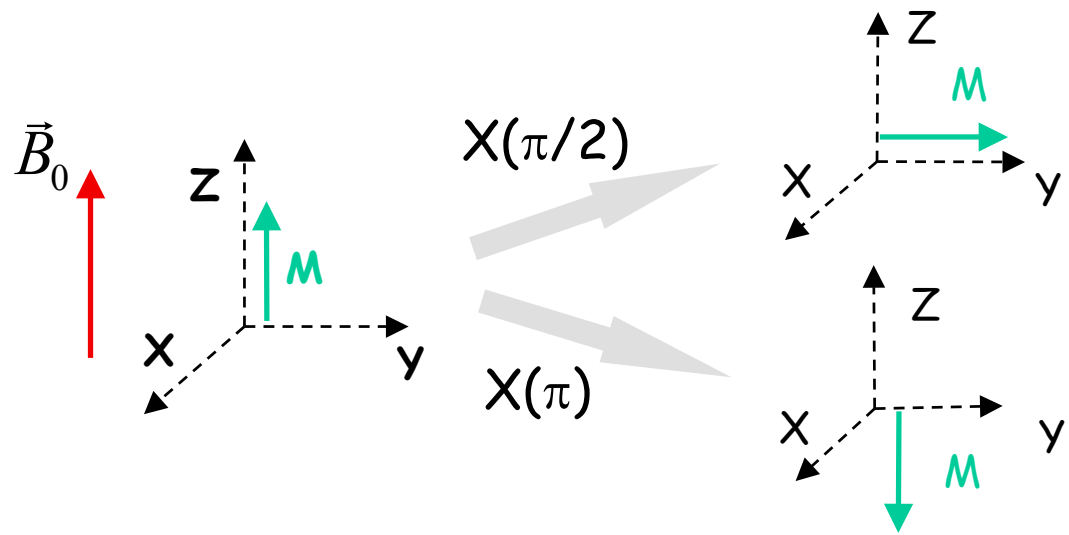
Aparece magnetización transversal con absorción de energía (equilibrio absorción-relajación)

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

NMR pulsado

✓ Pulsos "duros": modifican la magnetización (matriz densidad) en tiempos mucho más rápidos que la relajación, y con anchura de banda capaz de excitar todo el sistema de espines

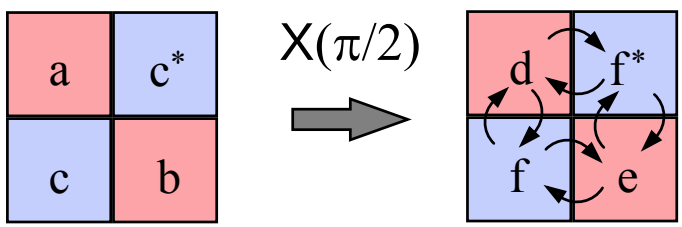


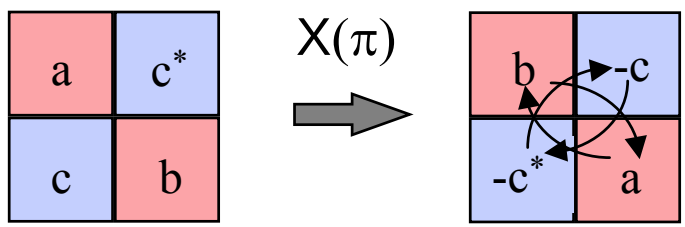


- $t_p << T_1, T_2$
- $\theta = \gamma B_1 t_p$

pulso π/2: transfiere poblaciones a coherencias y coherencias a poblaciones

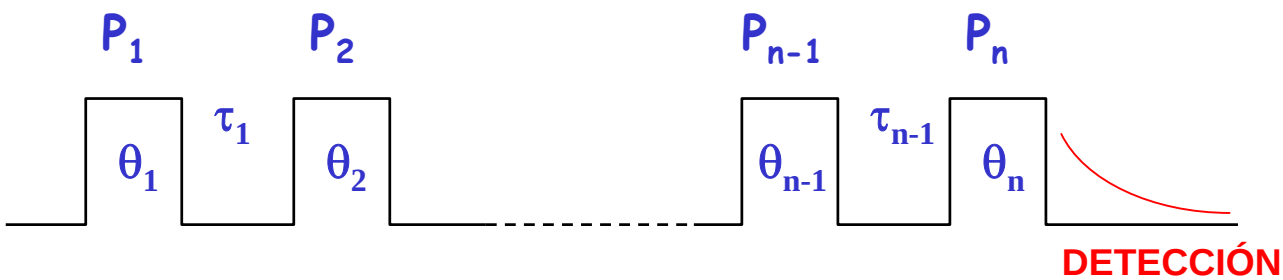
pulso π: intercambia coherencias y poblaciones





NMR pulsado: experimento general

Medida de la MAGNETIZACIÓN TRANSVERSAL tras la aplicación de una secuencia de pulsos a un sistema que parte del equilibrio



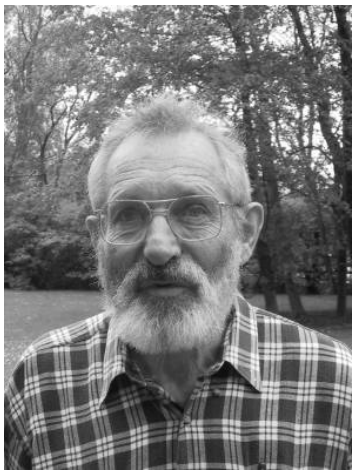
✓Se detecta la magnetización transversal

$$M_y = \langle I_y \rangle = tr(I_y\,\rho) = \sum_{m_i}\sum_{m'_i} \langle m_i | I_y | m'_i \rangle\, \rho_{m'_i m_i}$$

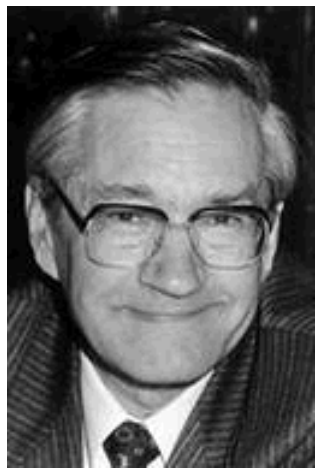
detección de coherencias entre estados de $(I_z)_n$

✓Las coherencias oscilan a frecuencias dadas por la diferencia de energía entre los estados: necesitamos conocer las energía (Hamiltoniano)

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR



Jean Jeener



Richard Ernst

Kurt Wüthrich

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Hamiltoniano (de espín) nuclear:

$$H = \underbrace{\mu_N g_N \vec{B} \cdot \sum_n \left(\vec{I}\right)_n}_{\text{Zemann nuclear}} - \underbrace{\mu_N g_N \vec{B} \cdot \sum_n \sigma_n \cdot \left(\vec{I}\right)_n}_{\text{Chemical Shift}} + \underbrace{\sum_{n,n'} J_{n,n'} \left(\vec{I}\right)_n \left(\vec{I}\right)_{n'}}_{\text{Acoplamiento escalar}} + \underbrace{\left(\mu_N g_N\right)^2 \sum_{n,n'} \frac{\left(\vec{I}\right)_n \left(\vec{I}\right)_{n'}}{r^3} - \frac{\left[\left(\vec{I}\right)_n \vec{r}\right]\left[\left(\vec{I}\right)_{n'} \vec{r}\right]}{r^5}}_{\text{Interacción dipolar}}$$

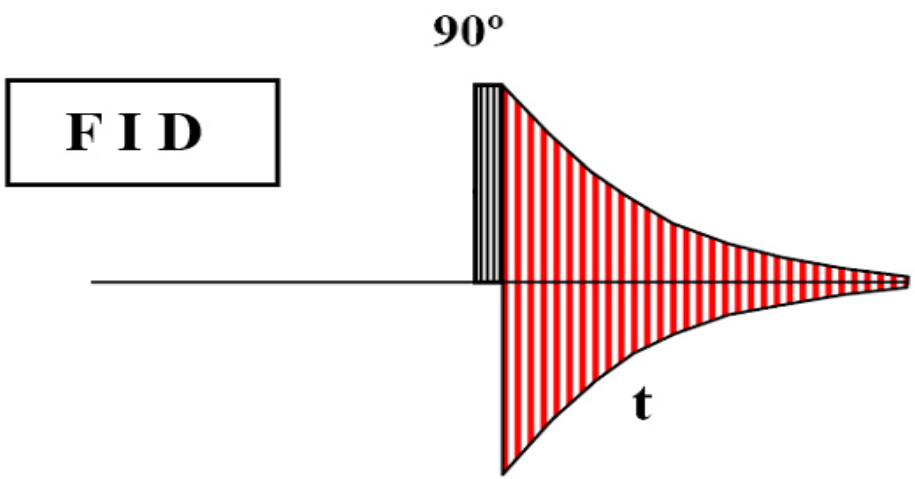
Interacciones a través de orbitales (conectividad a uno dos o tres enlaces)

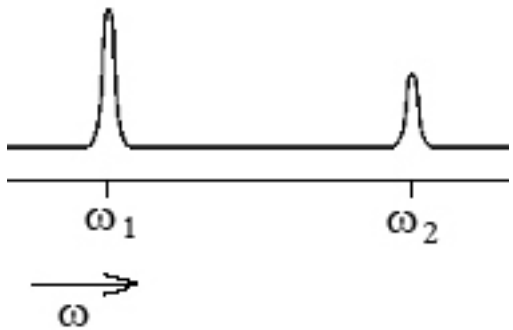
Interacciones entre espines distintos (los espines que interaccionan dejan de ser independientes y pueden presentar coherencias no nulas fuera del equilibrio

Da lugar al efecto Overhauser nuclear (NOE), dependiente de r^{-6}, sin conectividad

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Experimento “Decaimiento libre de la inducción”



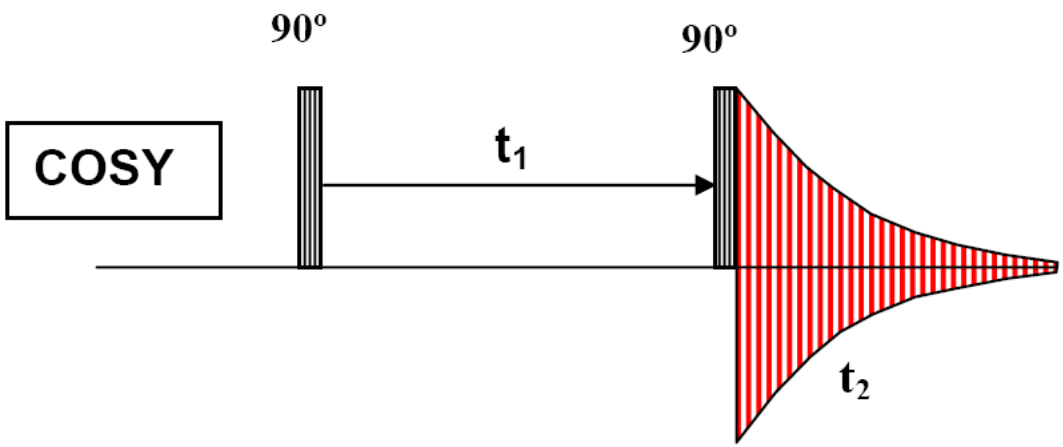


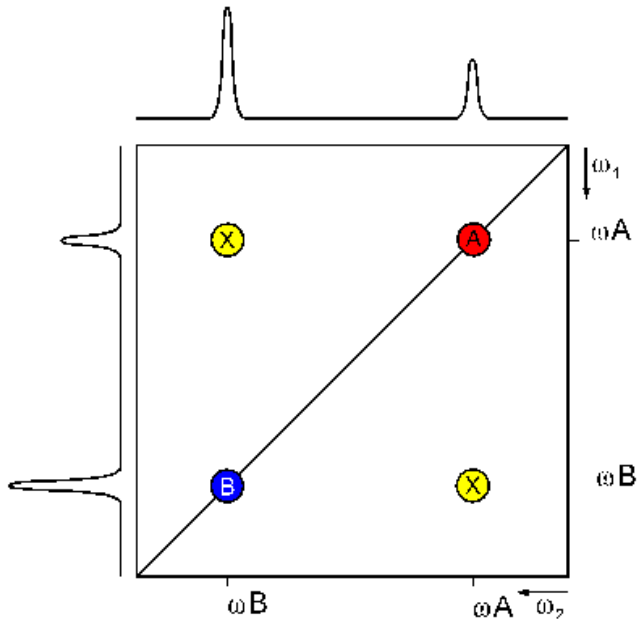
- ✓Se pueblan las coherencias entre estados del mismo núcleo
- ✓Oscilan con una frecuencia que es la diferencia entre las energías de los dos estados
- ✓El espectro (transformada de Fourier del FID) muestra picos que asignan las energías del Zeeman nuclear y Chemical Shift

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

✓Espectros multidimensionales: una correcta elección de las secuencias de pulsos permite detectar coherencias relacionadas con el acoplamiento escalar o con el NOE

Ejemplos:





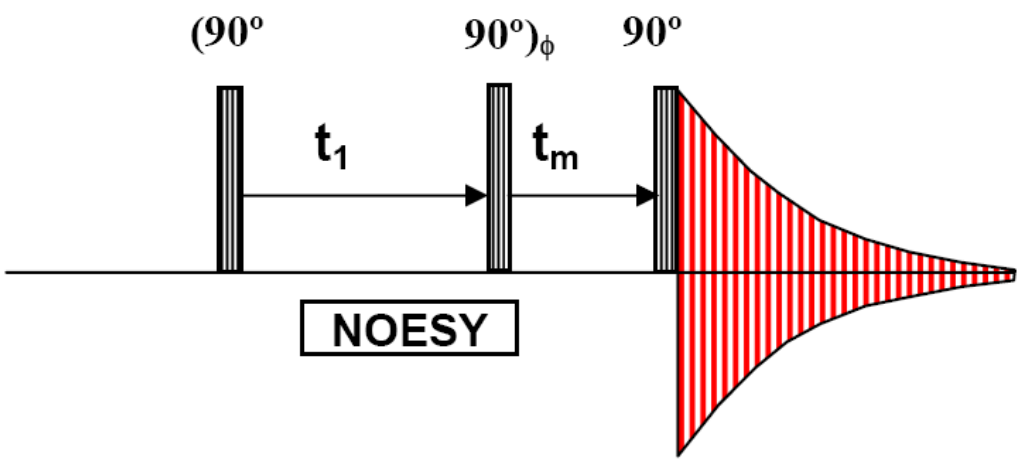
✓En la diagonal, picos del experimento FID (asignación del núcleo concreto)

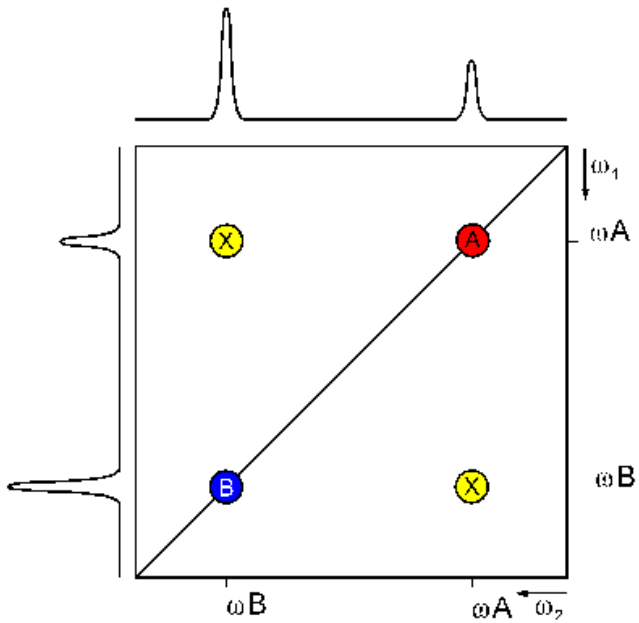
✓Fuera de la diagonal, correlaciones entre núcleos con interacción escalar exclusivamente

✓La intensidad de los picos no diagonales depende de la conectividad

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Ejemplos:





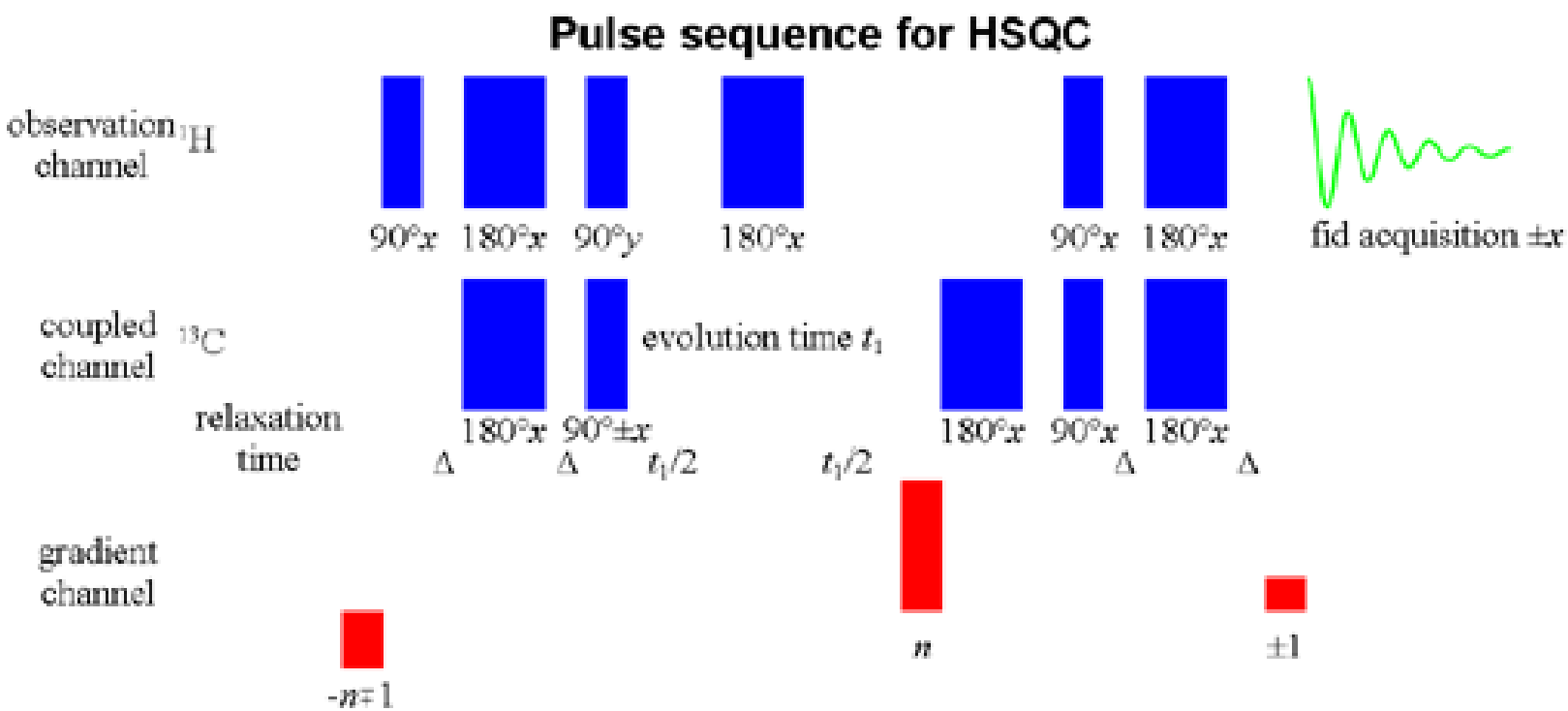
- ✓En la diagonal, picos del experimento FID (asignación del núcleo concreto)
- ✓Fuera de la diagonal, correlaciones entre núcleos con NOE exclusivamente
- ✓La intensidad de los picos no diagonales depende de la distancia
- ✓Se pueden ajustar los tiempos para excitar distintas coherencias NOE

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Ejemplos:

✓Experimentos heteronucleares: se detectan coherencias entre núcleos de naturaleza distinta

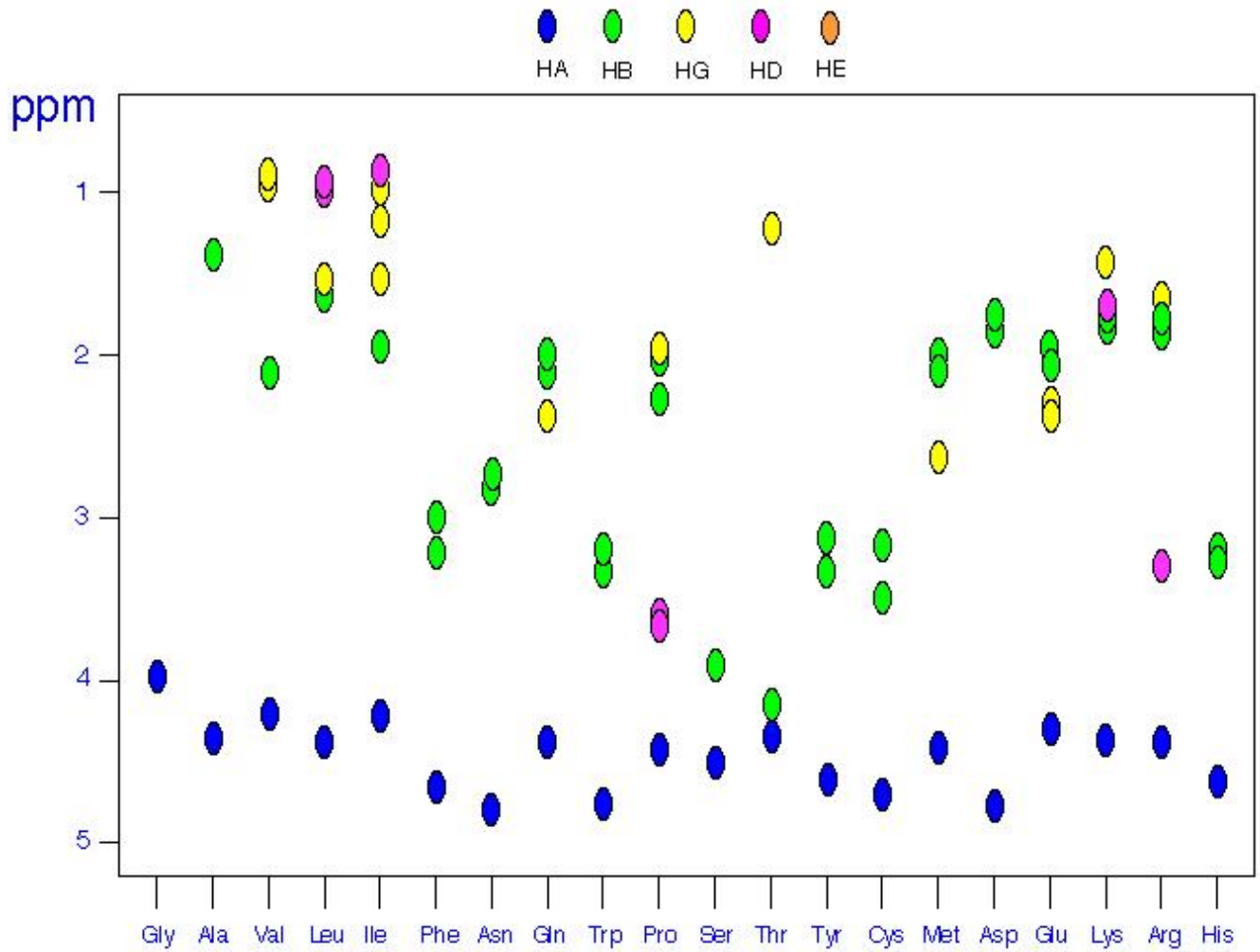
✓Se hace uso de las abundancias (relativas o enriquecidas) de ^{13}C, ^{17}O...



RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Estrategias para la resolución de estructuras:

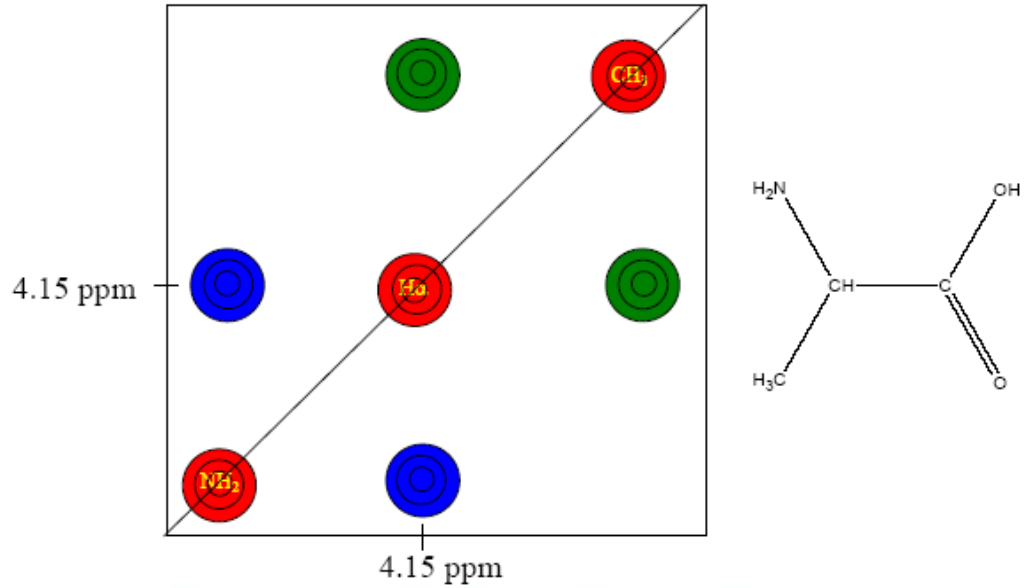
Desplazamientos químicos en los 20 aminoácidos



RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Estrategias para la resolución de estructuras:

Espectro COSY de la alanina



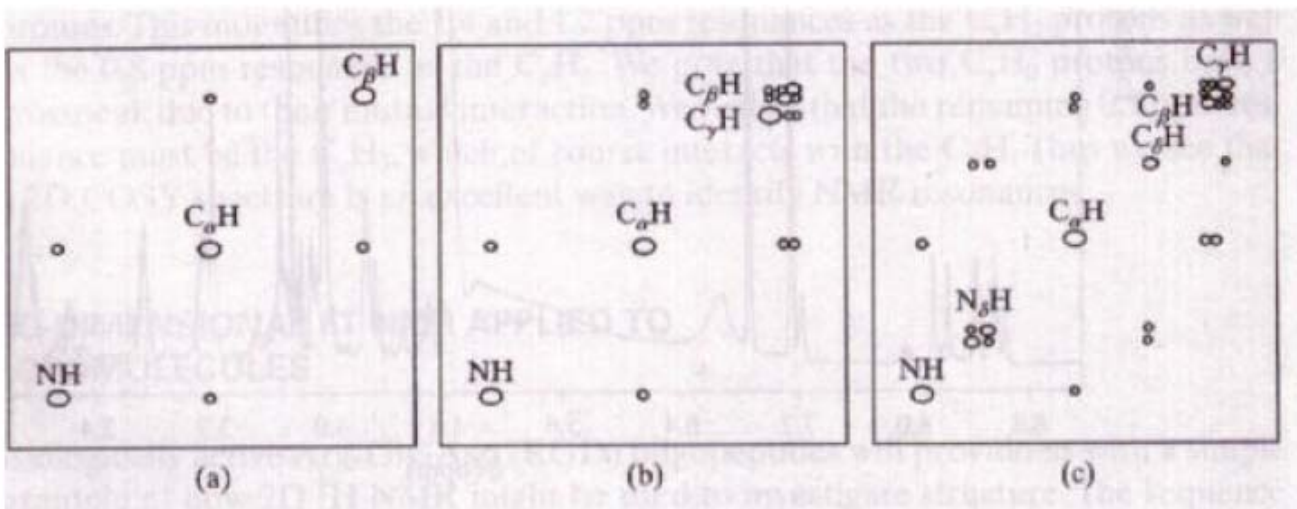
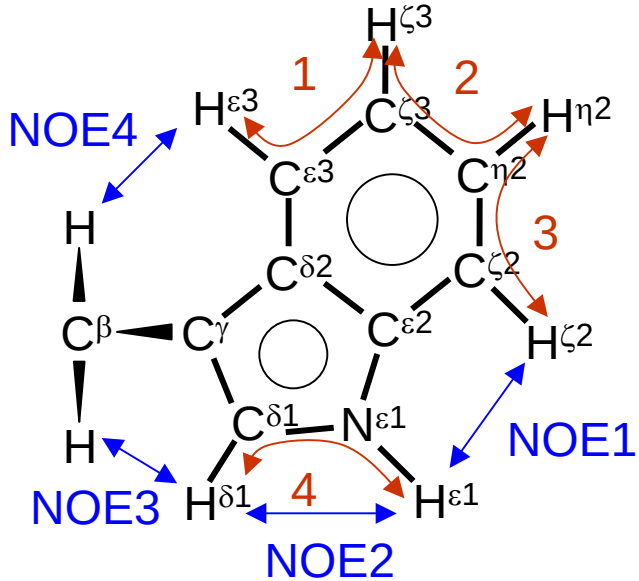


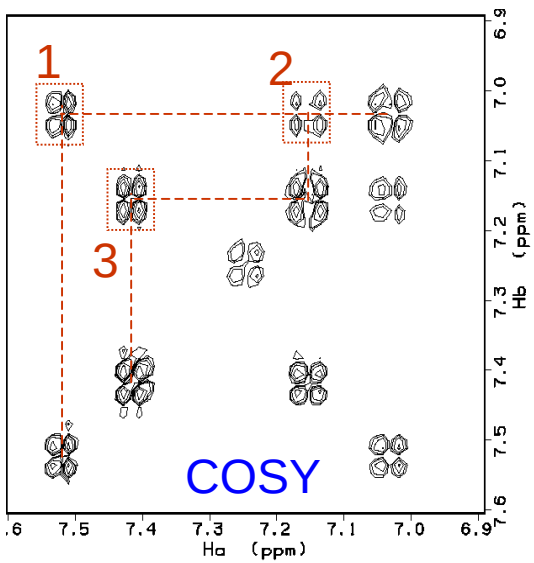
Figura III.11.3.- *Espectros COSY idealizados para (a) alalina, (b) ácido glutámico y (c) arginina.*

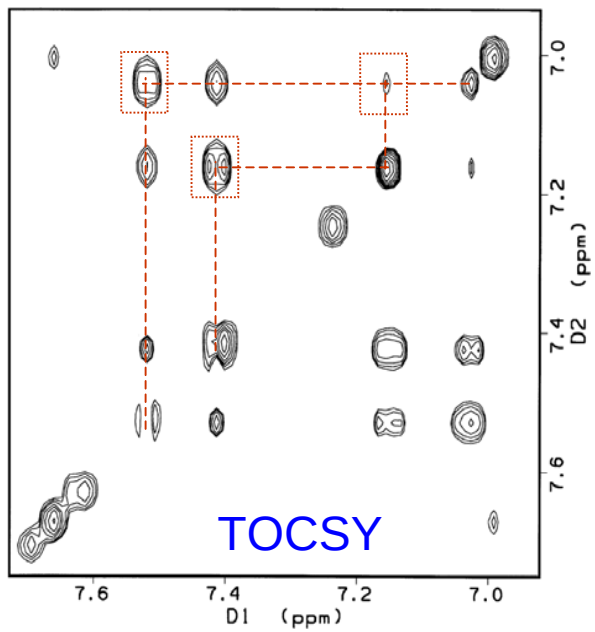
RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Estrategias para la resolución de estructuras:

Interacciones en el anillo aromático del residuo de triptófano



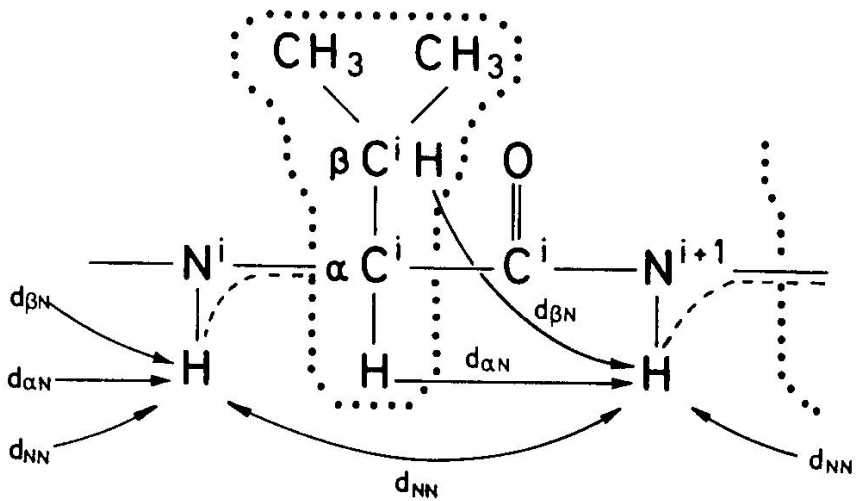




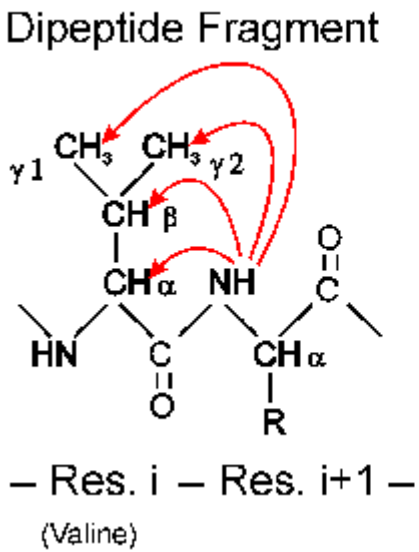
ASIGNACIÓN SECUENCIAL DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS

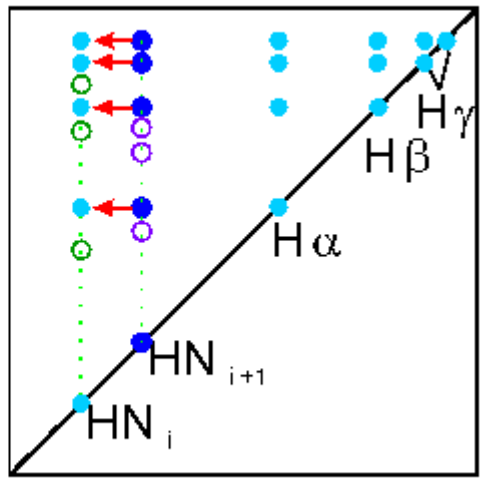
Para la asignación secuencial se hace uso del efecto NOE entre diferentes núcleos cercanos en el espacio: Espectro 2D-NOESY.

A principio de los 80, analizando las estructuras de un conjunto de proteínas, Kurt Wüthrich y cols. observaron que para la mayoría de los residuos las distacias entre protones de residuos adyacentes es en muchos casos menor de 5 Å.
Por tanto, debe poder observarse casi siempre un NOE (***NOE secuencial***) entre dichos núcleos.



El método de ***asignación secuencial*** propuesto por Wüthrich se basa en relacionar los sistemas de spin previamente identificados mediante los NOEs secuenciales en el espectro NOESY.

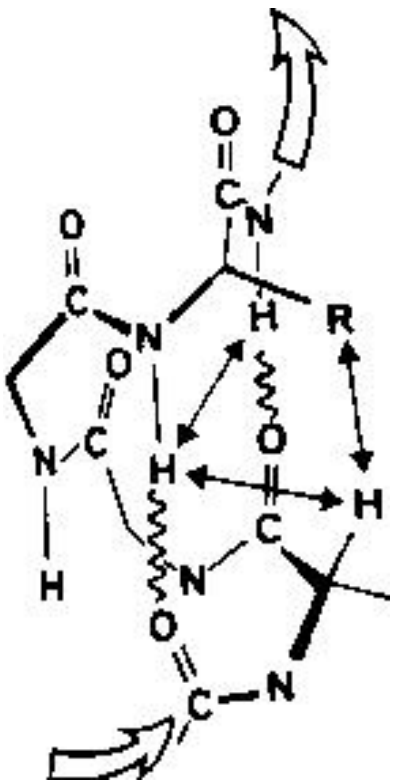




Una alternativa a este protocolo, propuesta por el grupo de Walter Englander, se llama ***asignación dirigida por la cadena principal***, que relaciona segmentos de la cadena principal mediante el uso combinado de NOEs secuenciales y de NOEs característicos de las diferentes estructuras secundarias.

Generalmente se utiliza una combinación de ambos métodos.

DISTANCIAS CORTAS CARACTERÍSTICAS DE LAS DIFERENTES ESTRUCTURAS SECUNDARIAS



Hélice α

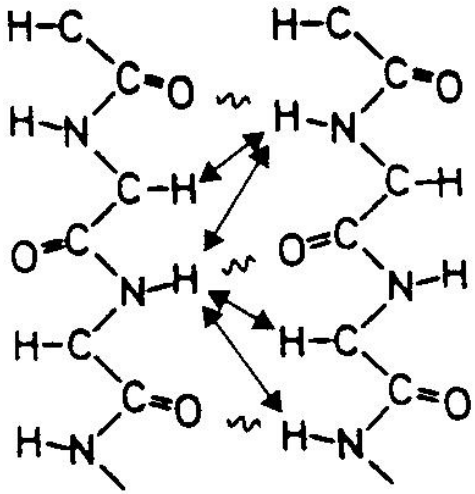


Lámina β paralela

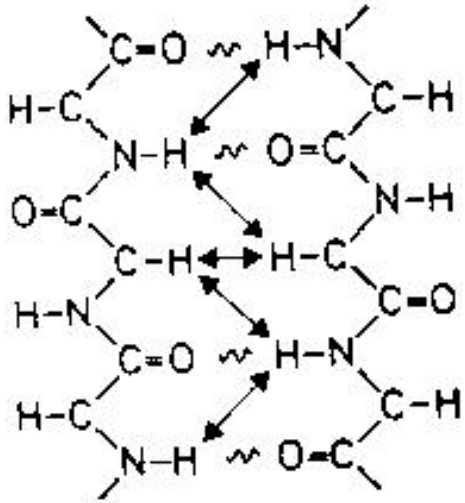
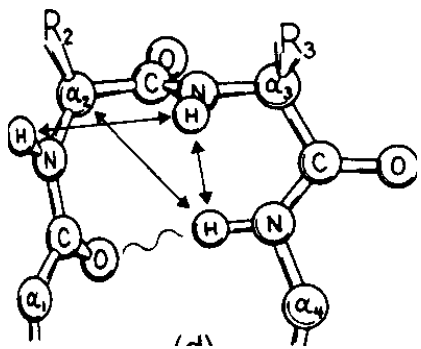
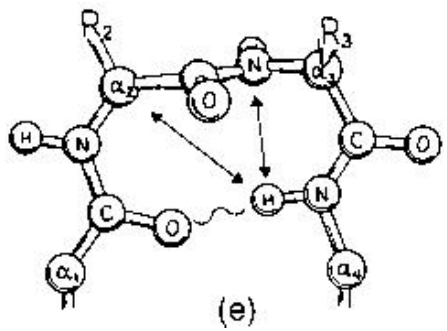


Lámina β antiparalela



Giro β tipo I



Giro β tipo II

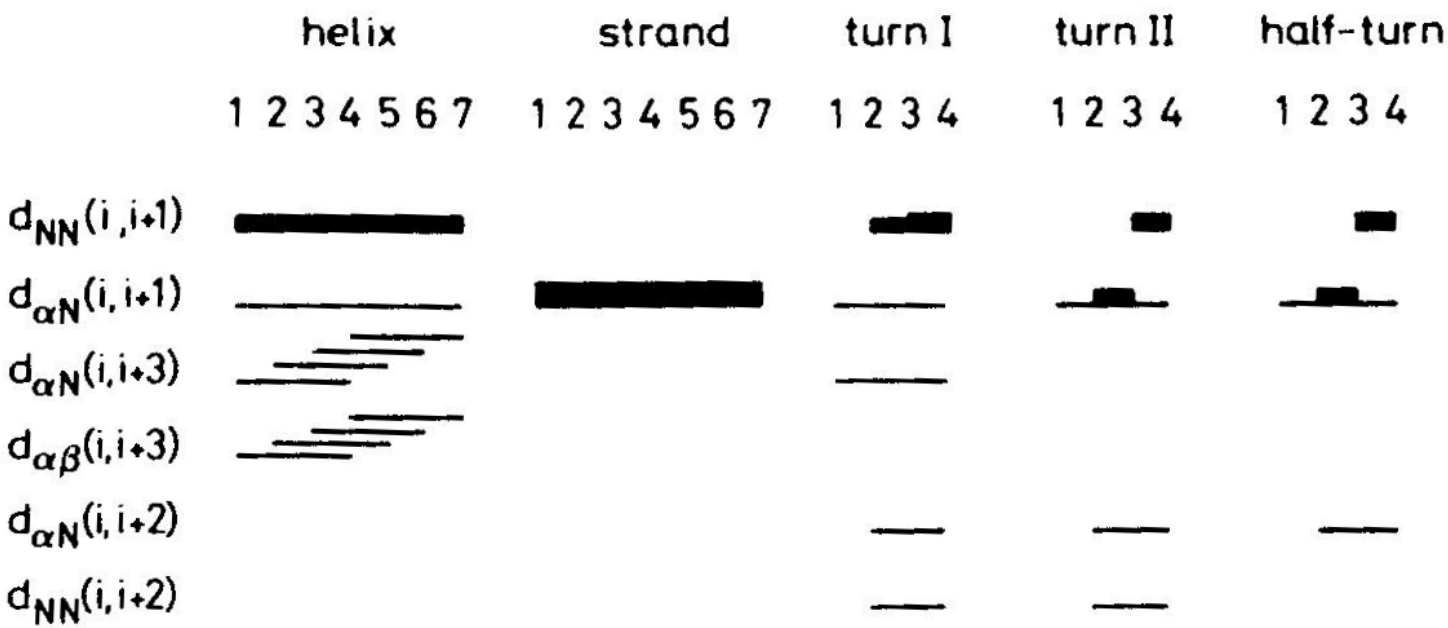
DISTANCIAS CORTAS CARACTERÍSTICAS DE LAS DIFERENTES ESTRUCTURAS SECUNDARIAS

Distance[b]	α-Helix[c]	3_{10} helix	β-antiparallel sheet	β-parallel sheet	Type I turn	Type II turn
$d_{\alpha N}(i,i)$	2.7	2.7	2.8	2.8	2.8/2.8	2.7/22
$d_{\alpha\beta}(i,i)^d$	2.2–2.9	2.2–2.9	2.2–2.9	2.2–2.9	2.2–2.9	2.2–2.9
$d_{\beta N}(i,i)^d$	2.0–3.4	2.0–3.4	2.4–3.7	2.6–3.8	2.0–3.5	2.0–3.4/3.2–4.0
$d_{\alpha N}(i,i+1)$	3.5	3.4	2.2	2.2	3.4/3.2	2.2/3.2
$d_{NN}(i,i+1)$	2.8	2.6	4.3	4.2	2.6/2.4	4.5/2.4
$d_{\beta N}(i,i+1)^d$	2.5–3.8	2.9–3.0	3.2–4.2	3.7–4.4	2.9–4.1/3.6–4.4	3.6–4.4
$d_{\alpha N}(i,i+2)$	4.4	3.8			3.6	3.3
$d_{NN}(i,i+2)$	4.2	4.1			3.8	4.3
$d_{\alpha N}(i,i+3)$	3.4	3.3			3.1–4.2	3.8–4.7
$d_{\alpha\beta}(i,i+3)^d$	2.5–4.4	3.1–5.1				
$d_{\alpha N}(i,i+4)$	4.2					
$d_{\alpha N}(i,j)^e$			3.2	3.0		
$d_{NN}(i,j)^e$			3.3	4.0		
$d_{\alpha\alpha N}(i,j)^e$			2.3	4.8		

Distancias cortas (< ≈2.5 Å) generalmente darán lugar a un NOE fuerte (pico de cruce intenso en el NOESY).
Distancias intermedias (≈2.5-3.5 Å) dan un NOE intermedio.
Distancias largas (≈ 3.5-5.0 Å) darán un NOE débil.

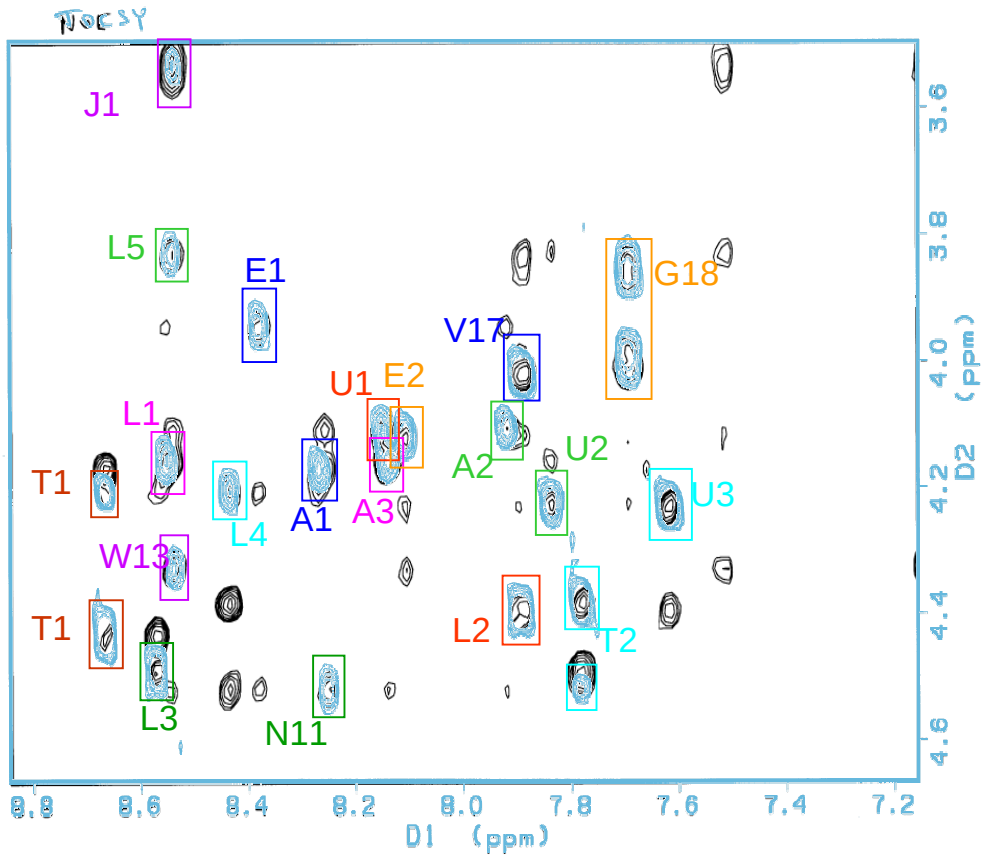
ESQUEMAS DE NOEs SECUENCIALES Y CARACTERÍSTICOS DE ESTRUCTURAS SECUNDARIAS

Se suelen realizar representaciones esquemáticas de los NOEs indicando su intensidad mediante el grosor de las líneas.



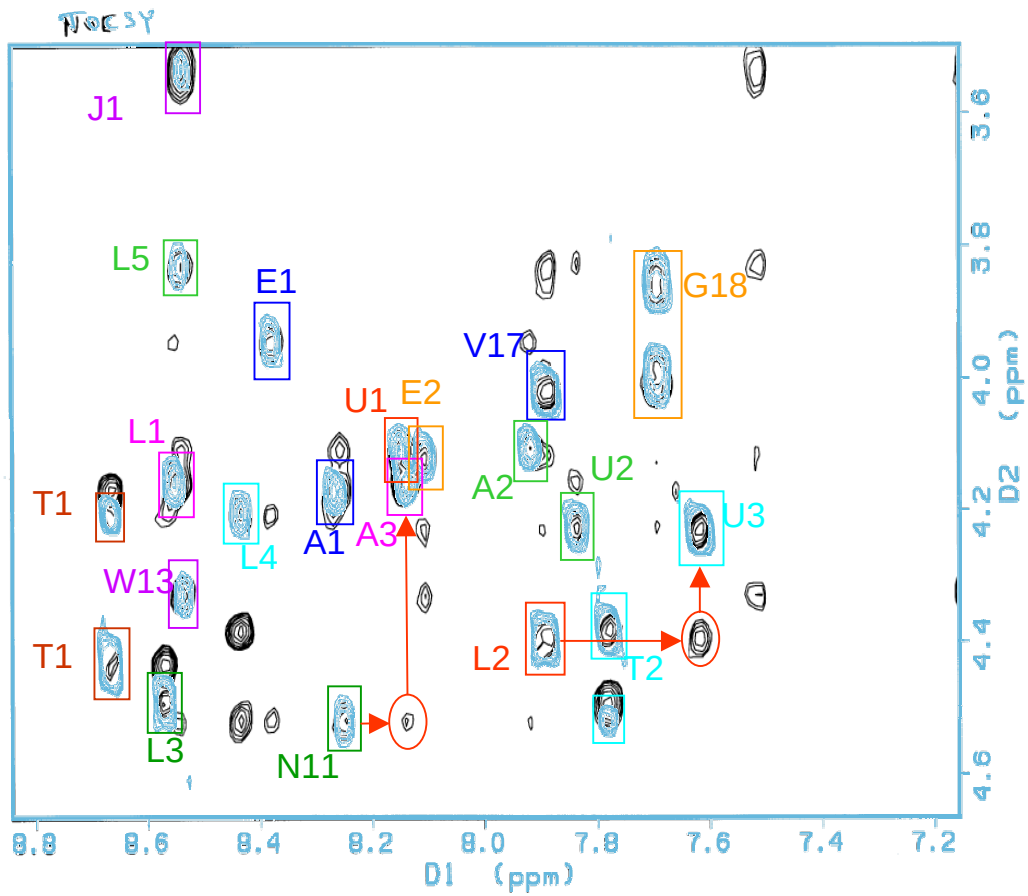
IDENTIFICACIÓN DE LOS TIPOS DE NOEs

Antes de proceder a la asignación secuencial, es necesario discernir entre NOEs intrarresiduo y NOEs interresiduo.
Para ello se superponen los espectros NOESY y TOCSY y se marcan los NOEs intrarresiduo. Los NOEs restantes son interresiduo (secuenciales ó a larga distancia)



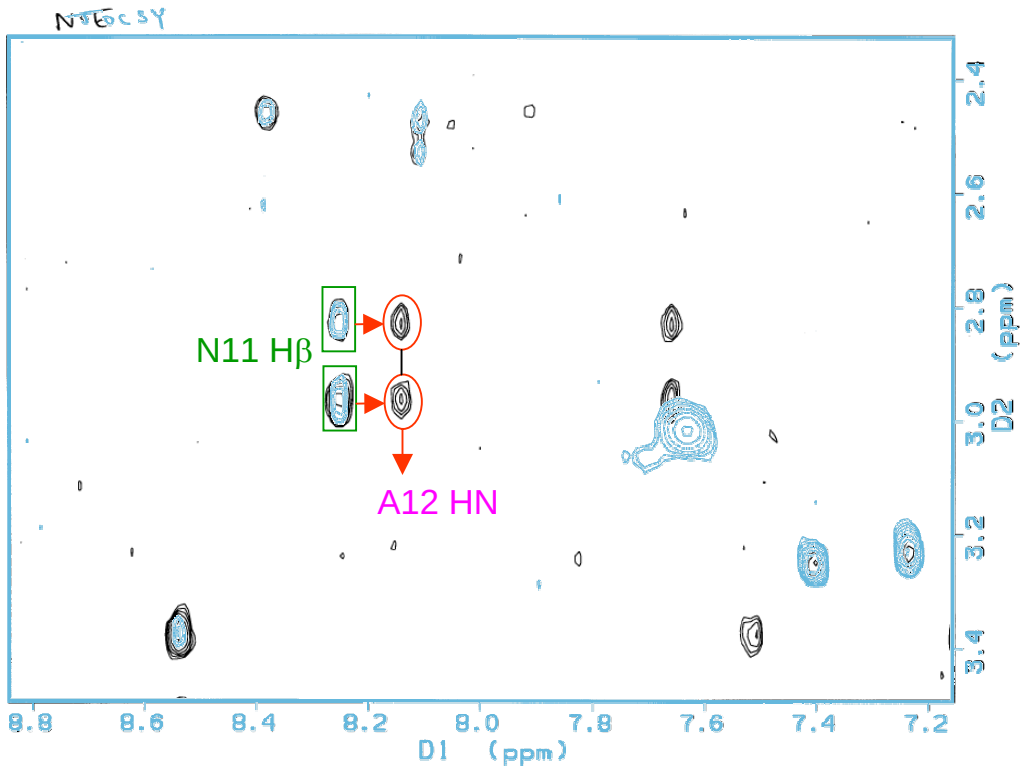
NOEs αN(i - i+1)

Generalmente se comienza relacionando pares de sistema de spin que correspondan a pares de residuos únicos en la secuencia
Ej. N11-A12 ó L19-K20(tipo U).
Esto nos permite identificar A12, L19 y K20.



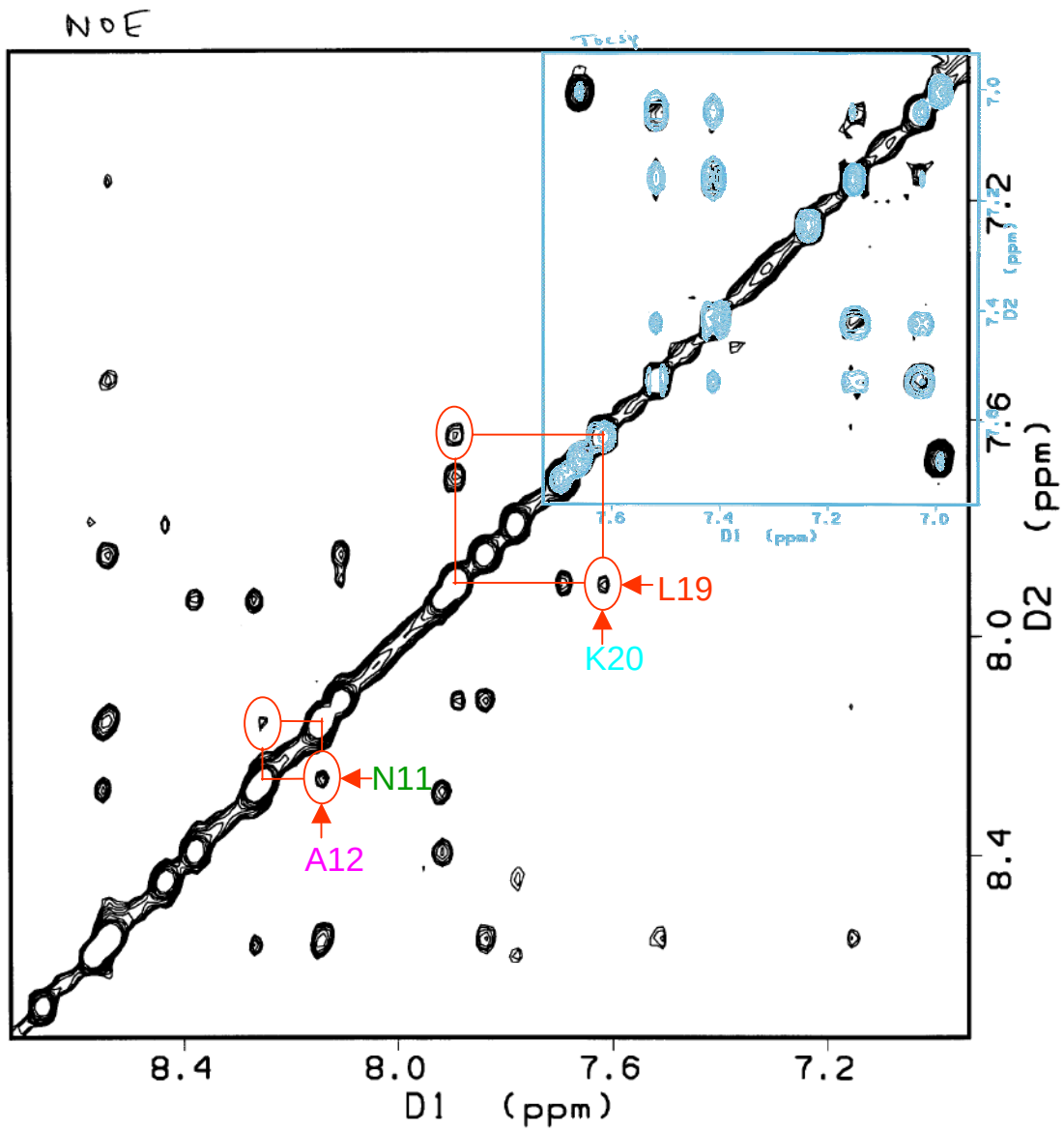
NOEs βN(i - i+1)

Generalmente los NOEs αN(i-i+1) se acompañan de NOEs βN(i-i+1) entre los mismos residuos.



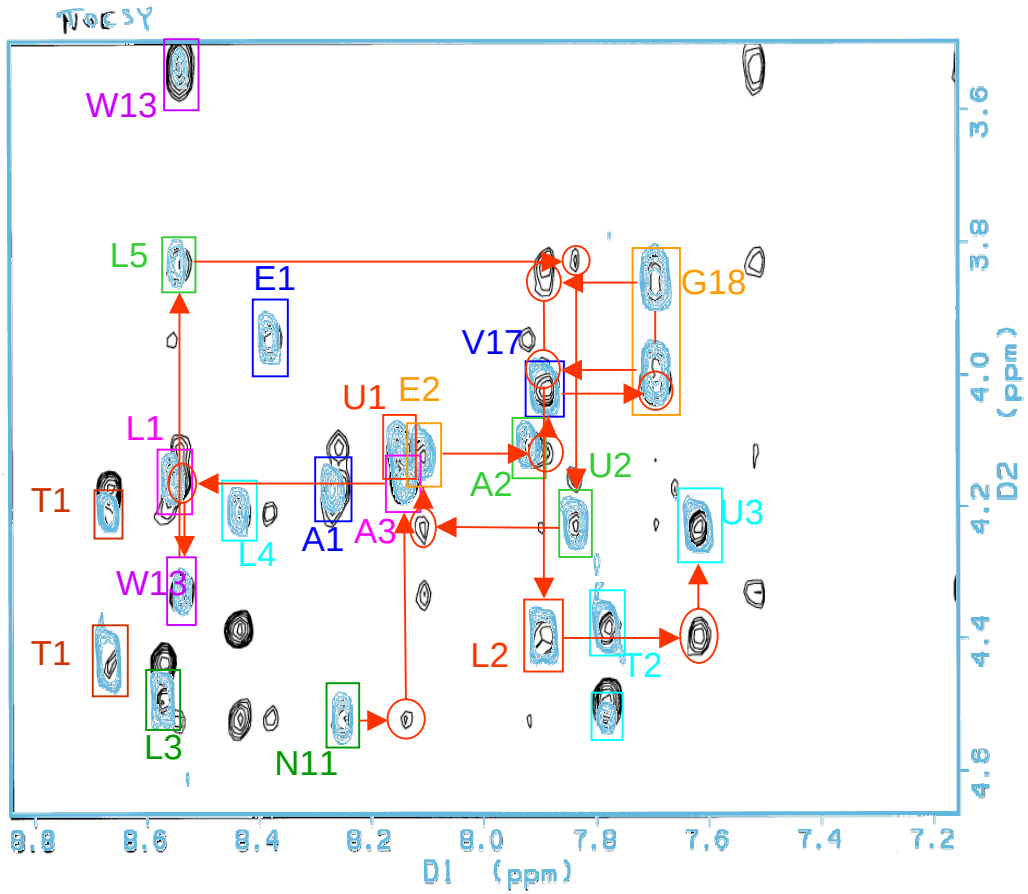
NOEs NN(i - i+1)

Se pueden observar también NOEs NN(i - i+1)



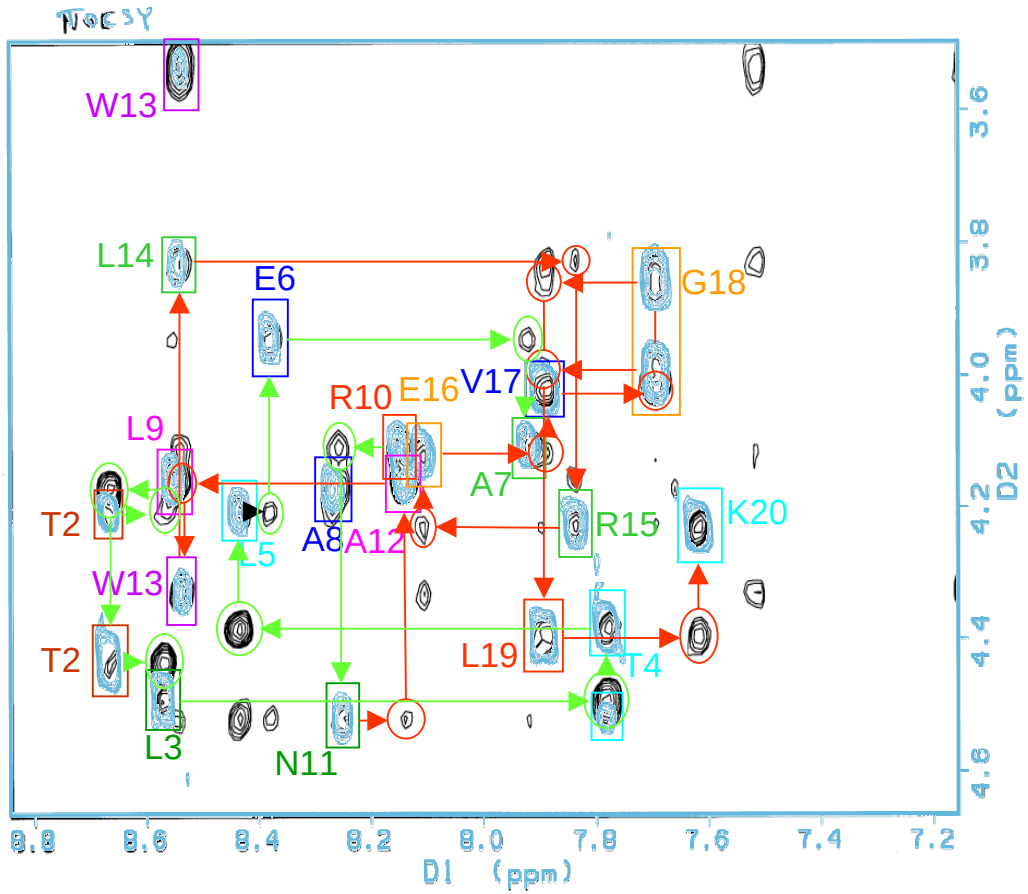
A partir de los pares de residuos identificados podemos ir extendiendo la asignación a lo largo de la secuencia.

Sistemas de spin: N11 A3 J1 L5 U2 E2 V17 G18 L2 U3
Secuencia: N11 A12 W13 L14 R15 E16 V17 G18 L19 K20

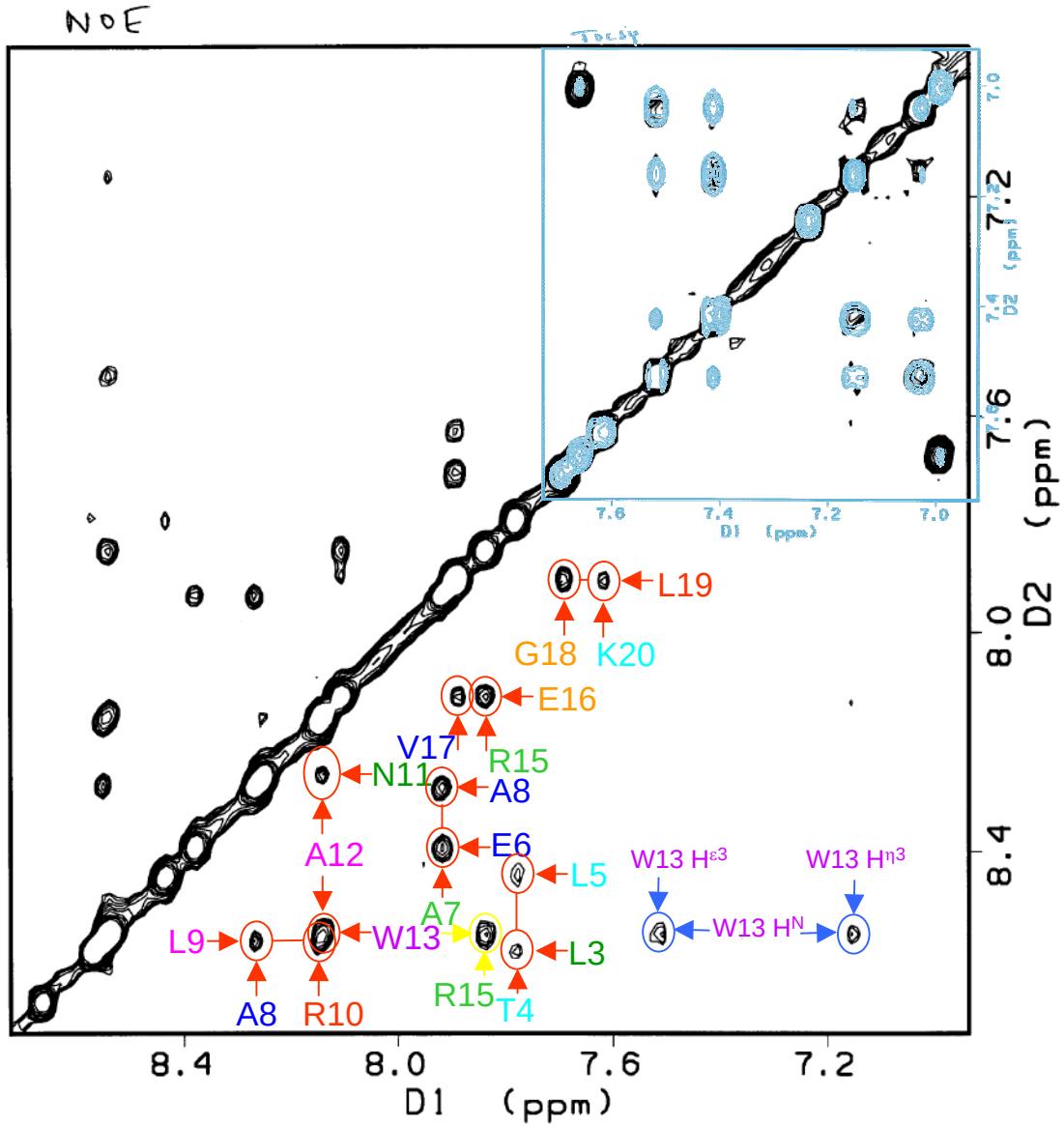


Resto de la asignación secuencial:

Sistemas de spin: U4 T1 L3 T2 L4 E1 A2 A1 L1 U1
Secuencia: K1 T2 L3 T4 L5 E6 A7 A8 L9 R10
Sistemas de spin: J2 A3 J1 L5 U2 E2 V17 G18 L2 U3
Secuencia: N11 A12 W13 L14 R15 E16 V17 G18 L19 K20



NOEs NN(i - i+1)


NOE
L19
G18
K20
E16
V17
R15
N11
A8
A12
E6
L5
W13 Hε3
W13 Hη3
A7
L9
W13
W13 HN
L3
A8
R10
R15
T4
8.4
8.0
7.6
7.2
D1 (ppm)
D2 (ppm)

ESQUEMA DE NOEs

A esta información se suelen añadir las constantes de acoplamiento $J_{HN\text{-}H\alpha}$ e información sobre la protección de cada HN frente al intercambio con deuterio.

LISTA DE ASIGNACIÓN COMPLETA.

Uniendo la información de la asignación secuencial con la identificación de las señales de cada sistema de spin, se obtiene la asignación completa que se suele expresar en forma de lista.

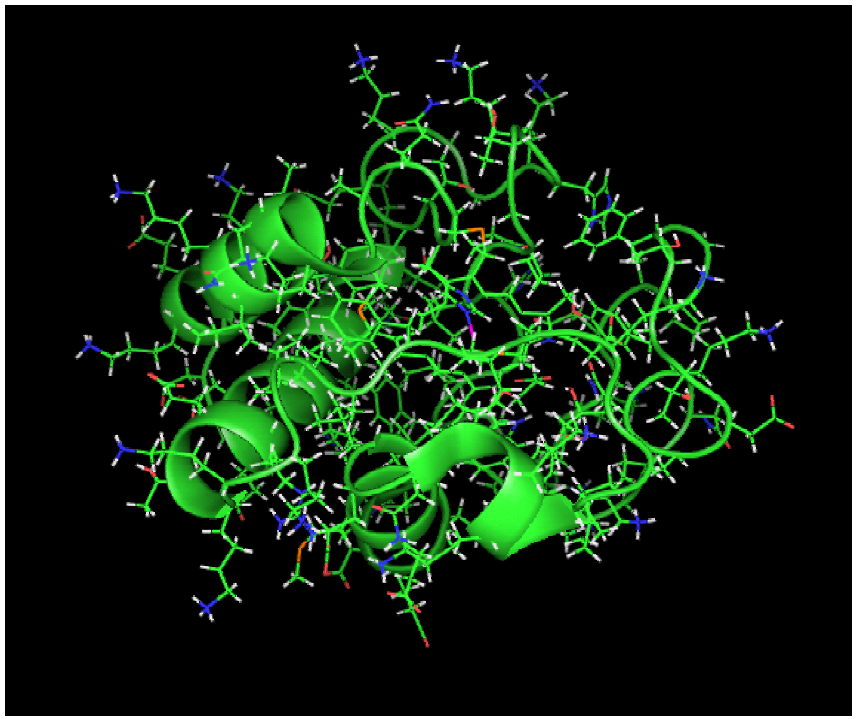
Sec.	NH	α H	β H	Otros	
K1	-	4.17	1.97,1.97	γCH2 1.54,1.54	δCH2 1.77,1.77 εCH2 3.07,3.07 ζNH3 7.70
T2	8.67	4.43	4.20	γCH3 1.28	γOH -
L3	8.57	4.49	1.71,1.71	γCH 1.73	δCH3 0.96, 0.91
T4	7.78	4.38	4.52	γCH3 1.33	γOH -
L5	8.43	4.20	1.74,1.74	γCH 1.64	δCH3 0.97, 0.93
E6	8.38	3.94	2.15,2.04	γCH2 2.46	
A7	7.92	4.10	1.54		
A8	8.27	4.17	1.57		
L9	8.56	4.15	1.87,1.48	γCH 1.80	δCH3 0.87, 0.87
R10	8.16	4.10	2.01,1.96	γCH2 1,83,1.67	δCH2 3.23,3.23 εNH 7.24
N11	8.26	4.52	2.83,2.96		δNH2 6.98, 7,72
A12	8.14	4.16	1.61		
W13	8.54	4.33	3.37,3.54		ε1NH 9.83 δ1CH 7.15 ε3CH 7.41
					η1CH 7.15 ζ2CH 7.03 ζ3CH 7.52
L14	8.55	3.83	2.00,1.40	γCH 2.07	δCH3 0.98, 0.94
R15	7.84	4.22	1.96,1.82	γCH2 1.65,1,65	δCH2 3.25,3.25 εNH 7.40
E16	8.11	4.12	2.19,2.19	γCH2 2.46,2.52	
V17	7.89	4.02	1.89	γCH3 0.56,0.47	
G18	7.69	3.86,4.00			
L19	7.89	4.40	1.61,1.61	γCH 1.61	δCH3 0.89, 0.89
K20	7.62	4.23	1.83,1.67	γCH2 1.42,1.42	δCH21.72,1.72 εCH2 3.02,3.02 ζNH3 7.65

El banco de datos de desplazamientos químicos de RMN BioMagResBank (BMRB)

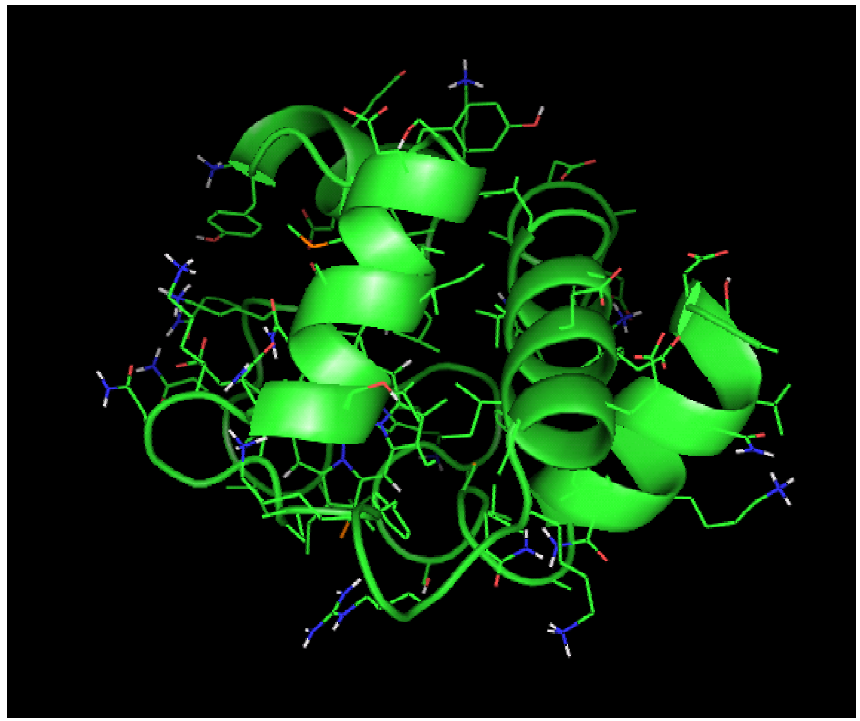
http://www.bmrb.wisc.edu/index.html

Contiene los desplazamientos químicos de unos 2900 péptidos, proteínas, DNA y RNA, además de parámetros relacionados con RMN, condiciones de estudio, datos de secuencias, datos cinéticos y termodinámicos obtenidos o relacionados con la RMN.

ESTRUCTURAS DE PROTEÍNAS



RMN



Difracción de rayos X

La estructura por RMN no requiere obtención de monocristales

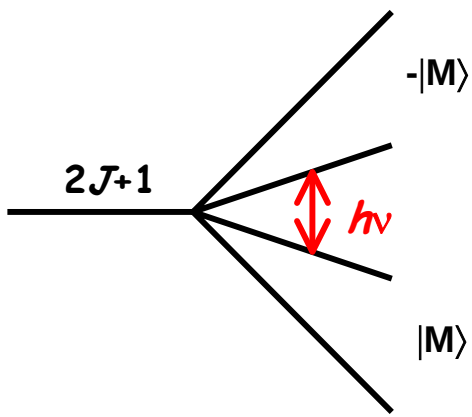
FENÓMENO DE LA RESONANCIA MAGNÉTICA
(caso espín electrónico)

Sistema asilado con momento angular ***J*** (degenración **2*J*+1**)

Razón giromagnética γ ⇨ Momento magnético $\vec{\mu} = \gamma \vec{J}$

Campo magnético estático $\vec{B}_0 = B_0 \hat{k}$ (Descenso de simetría **O(3)** → C_∞)

$$H = -\vec{B}_0 \cdot \vec{\mu} = -\gamma \vec{B}_0 \cdot \vec{J} = -\gamma B_0 J_z \quad \Rightarrow \quad E(M) = E_0 - \gamma B_0 M$$



Transiciones dipolares magnéticas $|\Delta M| = \pm 1$

Resonancia $h\nu = \gamma B_0$

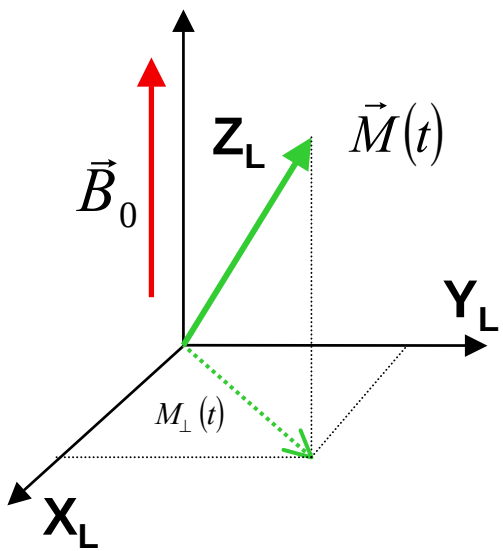
Electrones $\mu_B = \dfrac{|e|\hbar}{2mc} = 13.996 \text{ GHz/T}$ $\gamma = -g\,\mu_B$

Núcleos $\mu_n = \mu_B \left(\dfrac{m}{m_p}\right) = \dfrac{1}{1836.11}\mu_B$ $\gamma = -g_N\,\mu_N$

De acuerdo con $h\nu = \gamma B_0$ la resonancia se puede obtener experimentalmente variando la frecuencia, ν, o el campo estático, B_0.

RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA

Evolución de la magnetización bajo campo estático



$$\vec{B}_0 = B_0 \hat{k}$$

$$\gamma = \mu_N \, g_N$$

$$\vec{M} = \langle \vec{I} \rangle$$

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = -\gamma \, \vec{M} \wedge \vec{B}_o$$

$$\frac{dM_x}{dt} = \omega_L \, BM_y$$

$$\frac{dM_y}{dt} = -\omega_L \, BM_x$$

$$\frac{dM_z}{dt} = 0$$

$$\omega_L = \gamma \, B_o \Longleftarrow$$

Frecuencia de Larmor
(propia de cada núcleo)

$$M_x(t) = M_\perp(0) \cos(\omega_L t)$$

$$M_y(t) = M_\perp(0) \sin(\omega_L t)$$

$$M_z(t) = M_z(0)$$

La magnetización realiza una precesión en torno al campo magnético estático

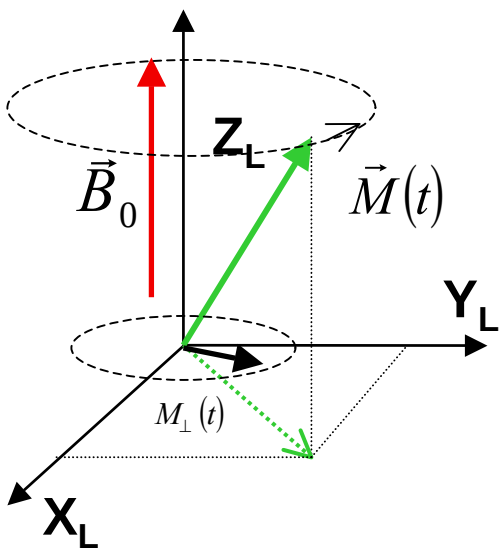
RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA

$$M_x(t) = e^{-t/T_2} M_\perp(0)\cos(\omega_L t)$$
$$M_y(t) = e^{-t/T_2} M_\perp(0)\sin(\omega_L t)$$
$$M_z(t) = M_z^{eq} - e^{-t/T_1}\left[M_z^{eq} - M_z(0)\right]$$

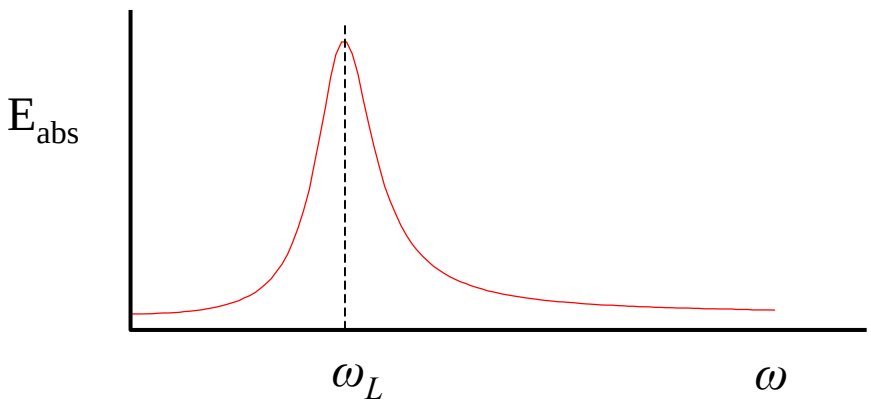
La precesión de la magnetización relaja al estado de equilibrio a través de la interacción con los modos de energía de la red

Microondas: introducen un campo transversal, débil y variable

$$\vec{B}_1(t) = B_1\left[\cos(\varpi\, t)\,\vec{i} + sen(\varpi\, t)\,\vec{j}\right]$$



Cuando $\omega = \omega_L$, el campo de microondas se acopla a la magnetización, y se produce absorción de energía (resonancia)

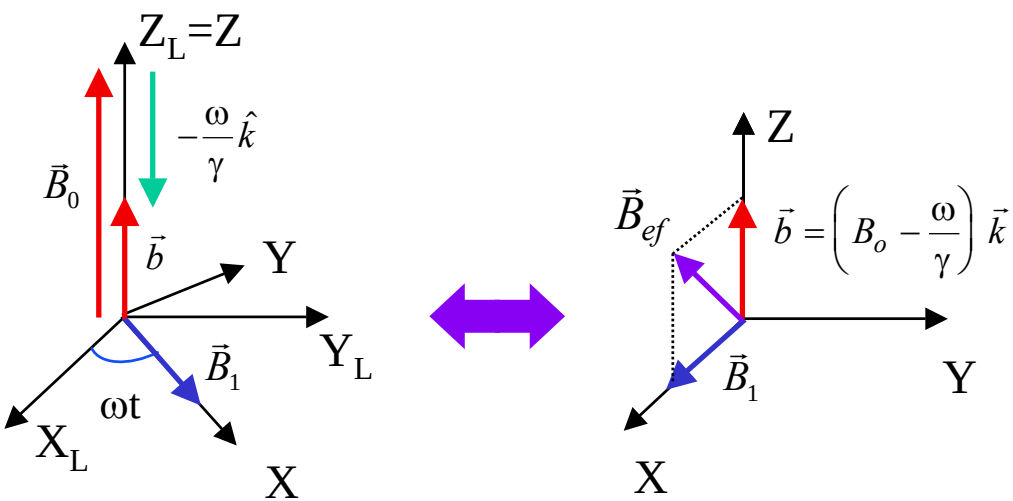


RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA

DESCRIPCIÓN EN COORDENADAS ROTATORIAS

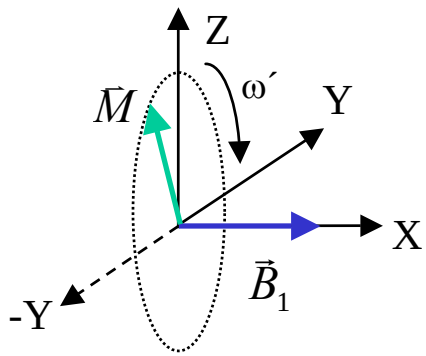
(ejes rotando en torno a Z con una frecuencia ω)

El comportamiento de $\vec{M}$ se describe con las mismas ecuaciones, considerando un campo efectivo $\vec{B}_{ef}=\vec{B}-\omega\gamma^{-1}\vec{k}$.



resonancia

- ✓ Para $\omega=\omega_L, \vec{b}=0$: la magnetización precede en el plano Z-Y, pasando a estados de energía más alta



RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA

DESCRIPCIÓN CUÁNTICA

La magnetización $\vec{M} \propto tr\,(\rho\,\vec{S}\,)$ es el la magnitud macroscópica asociada al observable espín

MATRIZ DENSIDAD:
sistema S = 1/2

$$\rho = \begin{array}{c|cc} & \alpha\ |+1/2\rangle & \beta\ |-1/2\rangle \\ \hline \alpha\ |+1/2\rangle & \mathbf{a} & \mathbf{c}^* \\ \beta\ |-1/2\rangle & \mathbf{c} & \mathbf{b} \end{array} + \frac{1}{2} I$$

Elementos diagonales
(POBLACIONES)

- **En el equilibrio** $a_o = -b_0 \neq 0$
- **Evolución temporal** $a(t) = a_o - \left(a_o - a(0)\right) e^{-t/T_1}$

$$b(t) = b_o - \left(b_o - b(0)\right) e^{-t/T_1}$$

Elementos no diagonales
(COHERENCIAS)

- **En el equilibrio** $c = 0$
- **Evolución temporal** $c(t) = c(0)\, e^{-i\,\frac{E_j - E_i}{2\pi h}\,t}\; e^{-t/T_2}$

RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA

Hamiltoniano de espín:

$$H = \underbrace{\vec{S}\cdot\tilde{D}\cdot\vec{S}}_{\text{ZFS}} + \underbrace{\mu_B \vec{B}\cdot\tilde{g}\cdot\vec{S}}_{\text{Ze}} + \underbrace{\vec{S}\cdot\tilde{A}\cdot\vec{I}}_{\text{HF}} + \underbrace{\vec{I}\cdot\tilde{Q}\cdot\vec{I}}_{\text{cuadrupolar}} - \underbrace{\mu_N g_N \vec{B}\cdot\vec{I}}_{\text{Zn}}$$

✓Interacción en general anisótropa
✓Fuertemente influido por la configuración electrónica y el entorno (no caracteriza directamente en centro)

✓Interacción con el propio núcleo del átomo
✓Interacción con núcleos próximos, por conectividad o dipolar

✓**D**, tensor de traza nula
✓Sólo se da para S > ½ (algunos metales, birradicales...)

RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA

INFORMACIÓN OBTENIBLE DE UN ESPECTRO DE EPR

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

- Espín electrónico (Valencia)
- Espín nuclear (Elemento)

PARÁMETROS ESPECTROSCÓPICOS

- Tensor g
- Tensor hiperfino
- ZFS
- shf
- .....

$\Longrightarrow$ Mapa distribución electrónica

DETERMINACIÓN ENTORNOS LOCALES

- Simetría local (anisotropías)

INTERACCIONES SISTEMA - BAÑO

- Tiempos de relajación
  - Reorientación
  - Difusión

$\Longrightarrow$ Procesos dinámicos

INTERACCIONES MAGNÉTICAS

- Interacciones entre especies magnéticas (pares, oligómeros)
- Sistemas concentrados (dipolar, canje)

SONDAS PARAMAGNÉTICAS PARA

- Transiciones de fase estructurales
- Orden en CL
- Atrapamiento de productos metaestables
- ....

.....

RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA

Caso $S = 1/2$, $I = 1/2$, g isótropo en interacción hiperfina:

$$H = \underbrace{\mu_B g\, BS_Z}_{H_0} + \underbrace{a\, I_z S_z + \frac{1}{2} a\left(S_+ I_- + S_- I_+\right) - g_N \mu_N B I_z}_{H_1}$$

$$|M,m\rangle \qquad (M = -S, S \quad m = -I, I) \qquad E^{(1)}(M,m) = g\mu_B BM + aMm - g_N \mu_N Bm$$

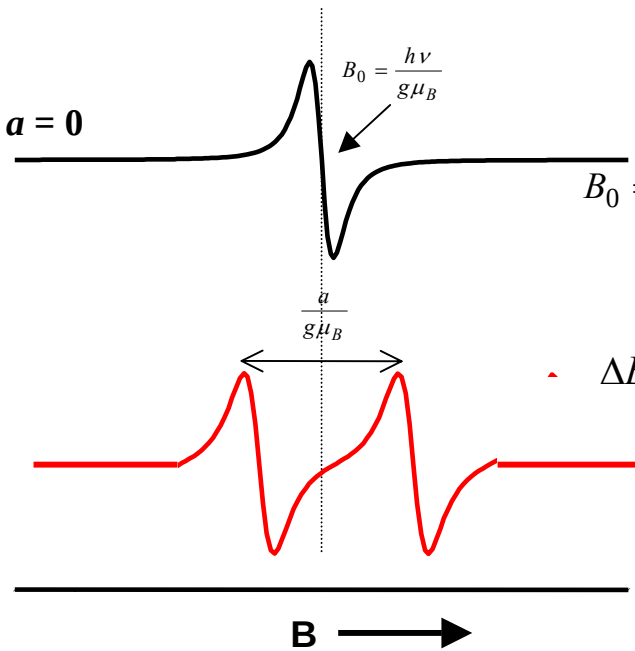
EPR regla de selección

$|\Delta M| = \pm 1$, $|\Delta m| = 0$

$$h\nu = g\mu_B B + am$$

$$B_m = \frac{h\nu}{g\mu_B} - \frac{a}{g\mu_B} m$$

Espectro de EPR $2I+1$ líneas

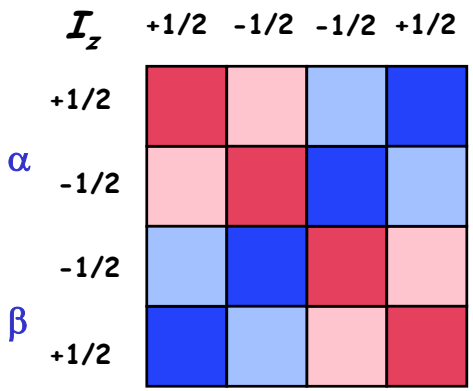


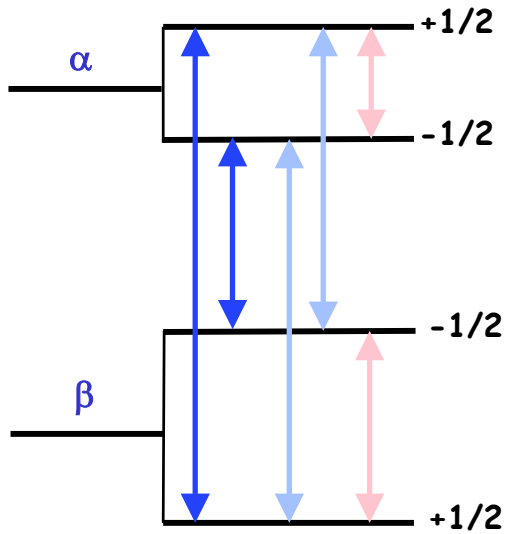
$$B_0 = \frac{1}{2I+1}\sum_m B_m = \frac{h\nu}{g\mu_B}$$

$$\Delta B = |B_{m+1} - B_m| = \frac{|a|}{g\mu_B}$$

RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA

Caso S = 1/2, I = 1/2, g isótropo en interacción hiperfina:





α : $S_z = +1/2$

β : $S_z = -1/2$

En el experimento contínuo se detectan las transiciones permitidas (coherencias dentro de La misma variedad de espín electrónico)

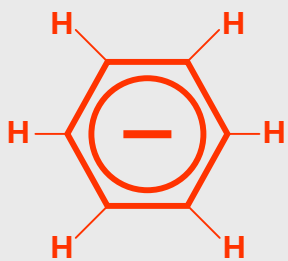
EPR regla de selección

$|\Delta M| = \pm 1, |\Delta m| = 0$

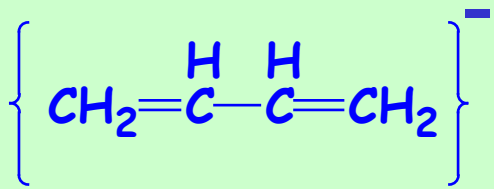
RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA

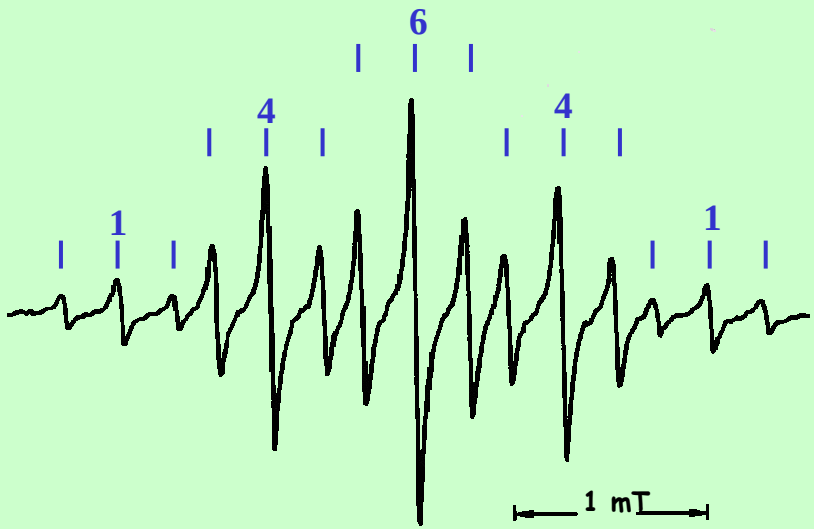
Interacción hiperfina con varios núcleos:

Anión benceno



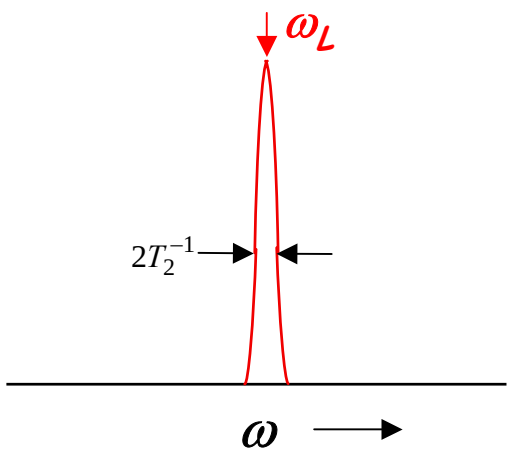
Anión butadieno



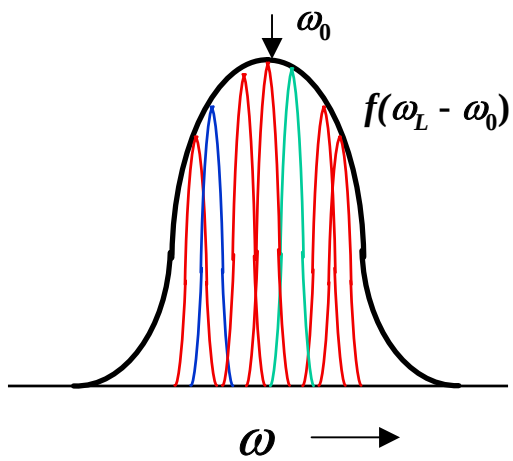


RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA

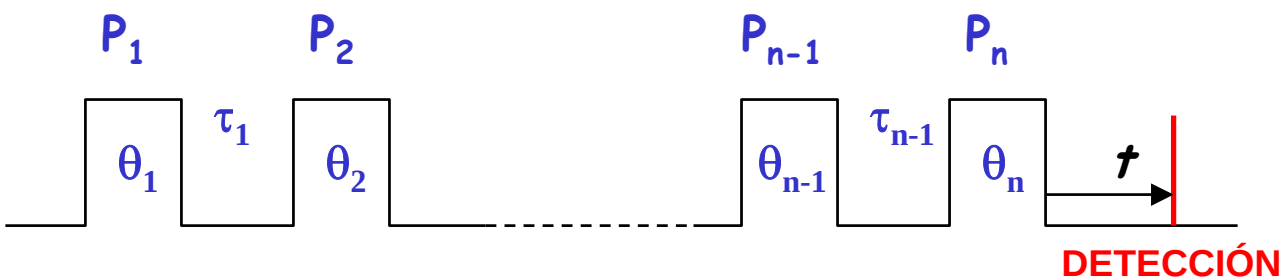
Anchura de línea homogénea



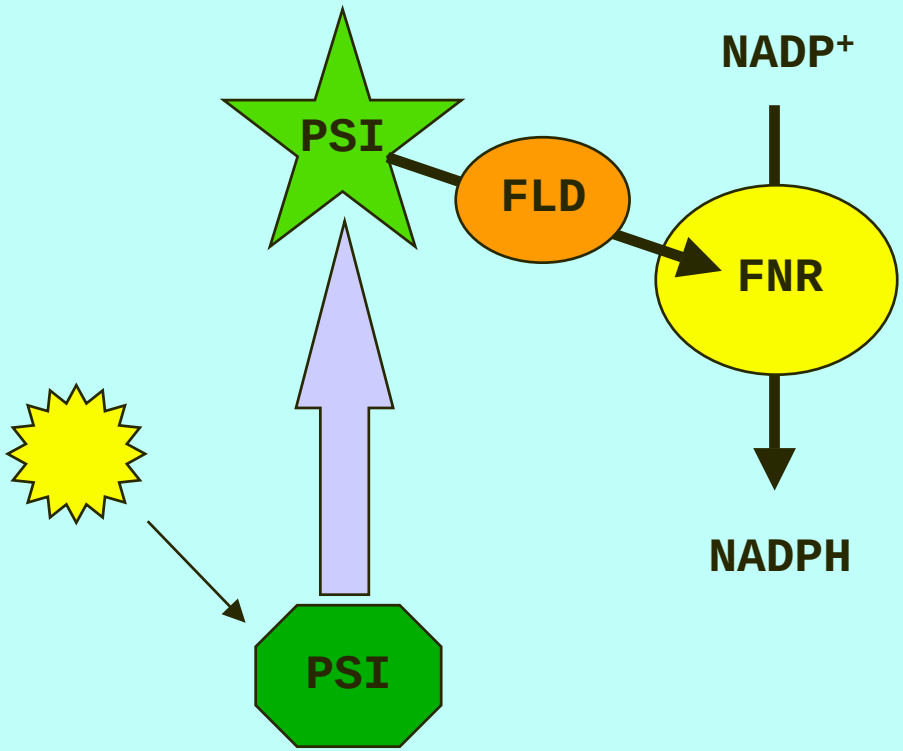
Ensanchamiento Inhomogéneo (interacción hiperfina, distintos centros, relajación inhomogénea...)



Solución: técnicas de pulsos permiten inducir coherencias entre transiciones ocultas en el ensanchamiento (en especial hiperfinas) y detectarlas



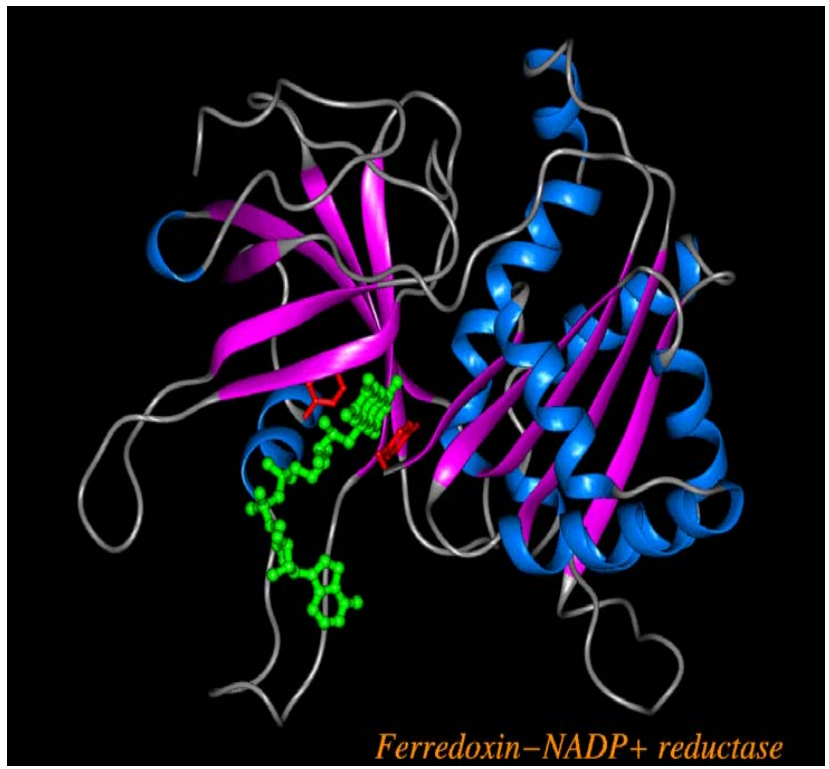
Producción Fotosintética de NADPH



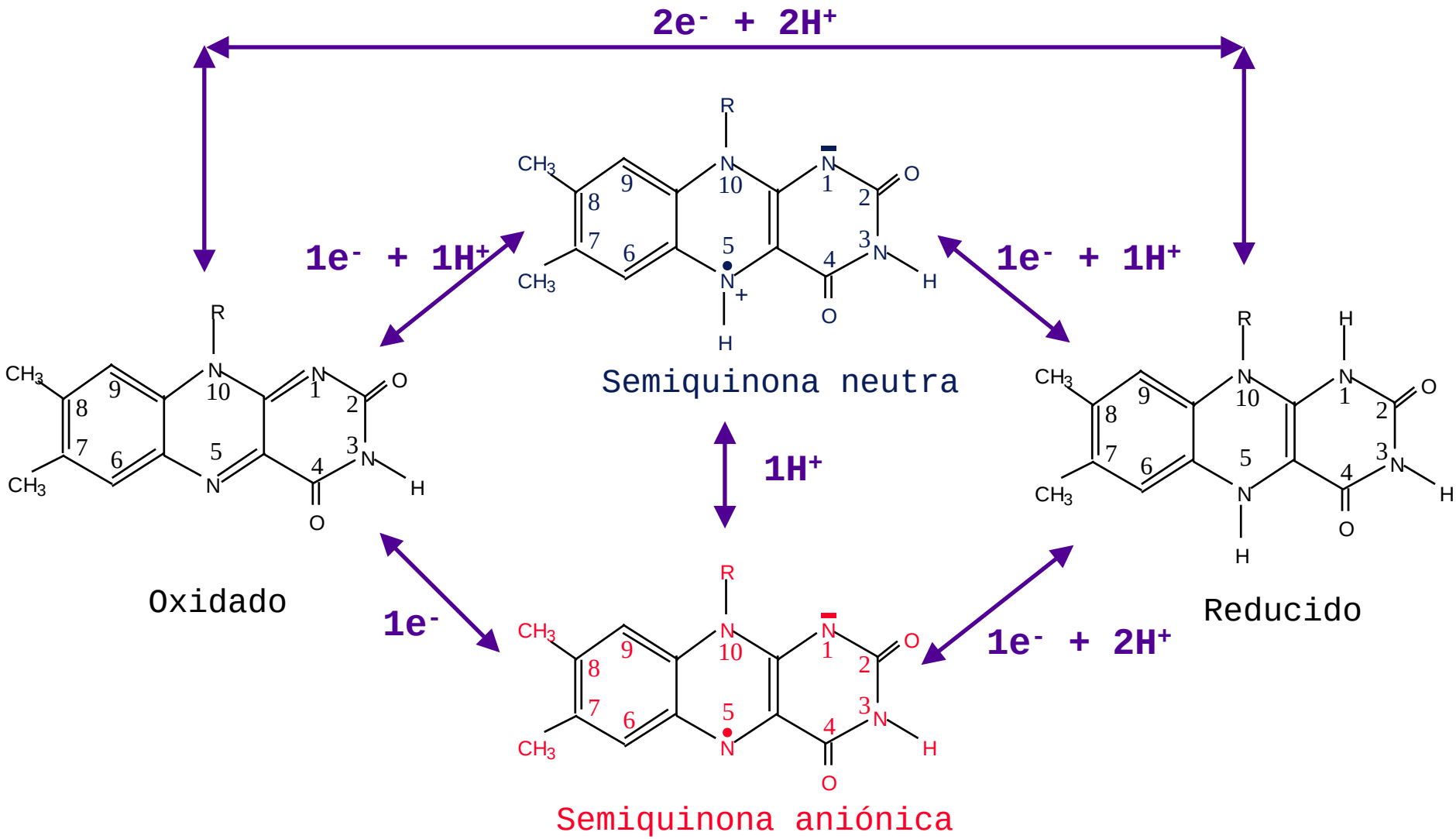
$$FLD_{rd} + FNR_{ox} \longrightarrow FLD_{sq} + FNR_{sq}$$

$$FLD_{rd} + FNR_{sq} \longrightarrow FLD_{sq} + FNR_{rd}$$

$$FNR_{rd} + NADP^{+} \longrightarrow FNR_{ox} + NADPH + H^{+}$$



Estados Redox del Anillo de Isoaloxazina en Flavoproteínas



EPR DE FLAVOPROTEÍNAS

¿Por qué?

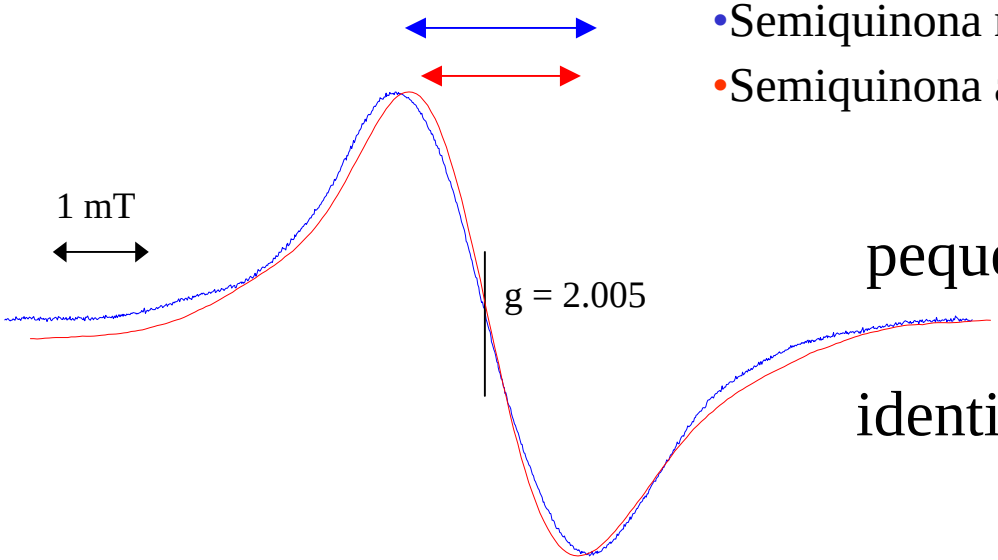
- ✓ Estado semiquinona, paramagnético (S = 1/2)
- ✓ Radical molecular: ¿distribución electrónica?
  - ✓ Estructura hiperfina: Interacción entre el espín del núcleo y el del electrón

Presencia del electrón en las proximidades del núcleo ⟺ Desdoblamiento hiperfino

"A knowledge of sites of high spin-density is of mechanistic importance in that it suggests potential sites where one-electron transfer could occur in flavoenzyme-catalysed reactions involving the semiquinone intermediate."

D. E. Edmondson, "Electron-spin resonance studies on flavoenzymes", *Biochem. Soc. Trans*. **13**, 593 (1985).

CW-EPR de flavoproteínas



- Semiquinona neutra
- Semiquinona aniónica

pequeñas diferencias en anchura:

identificación de la forma de flavina

✓ Diferencias de anchura por intercambios: $^{1}H \rightarrow {}^{2}H$ (D); $^{14}N \rightarrow {}^{15}N$

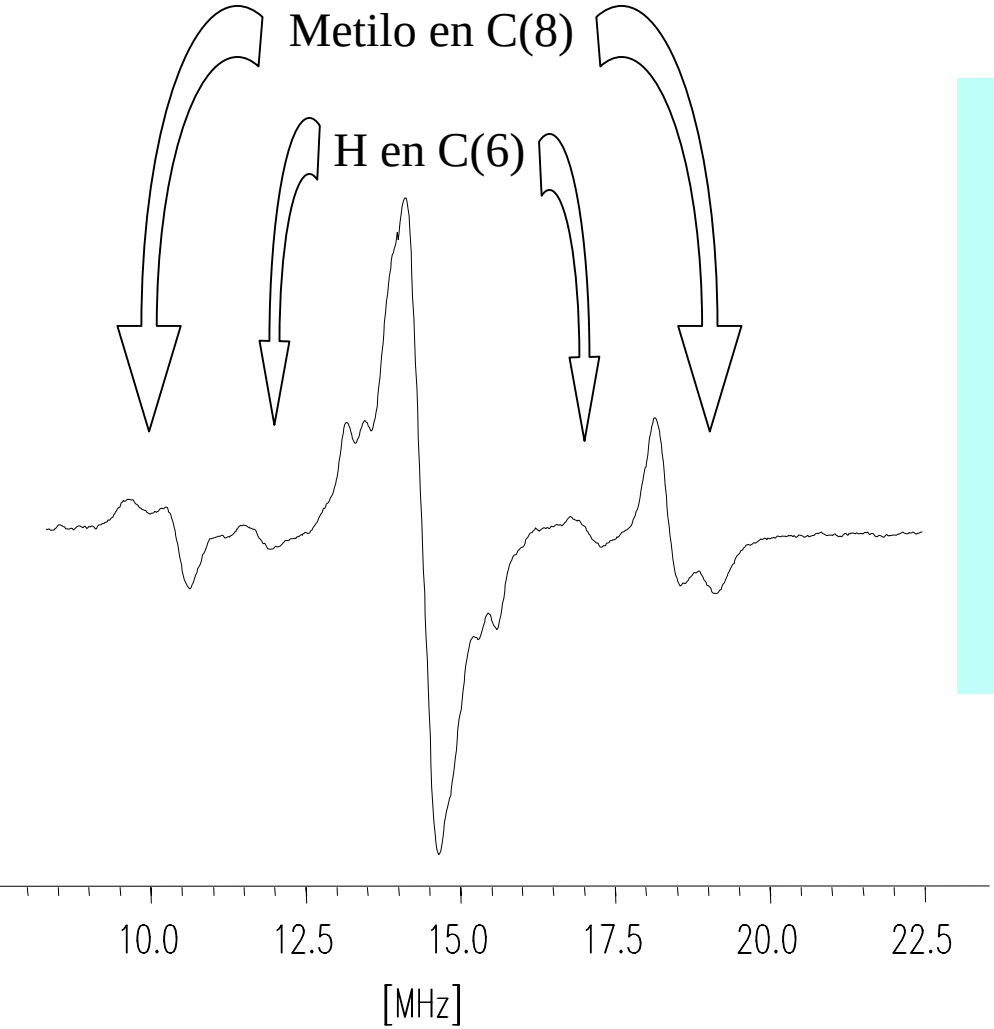
✓ Anchuras debidas a desdoblamiento hiperfino no resuelto

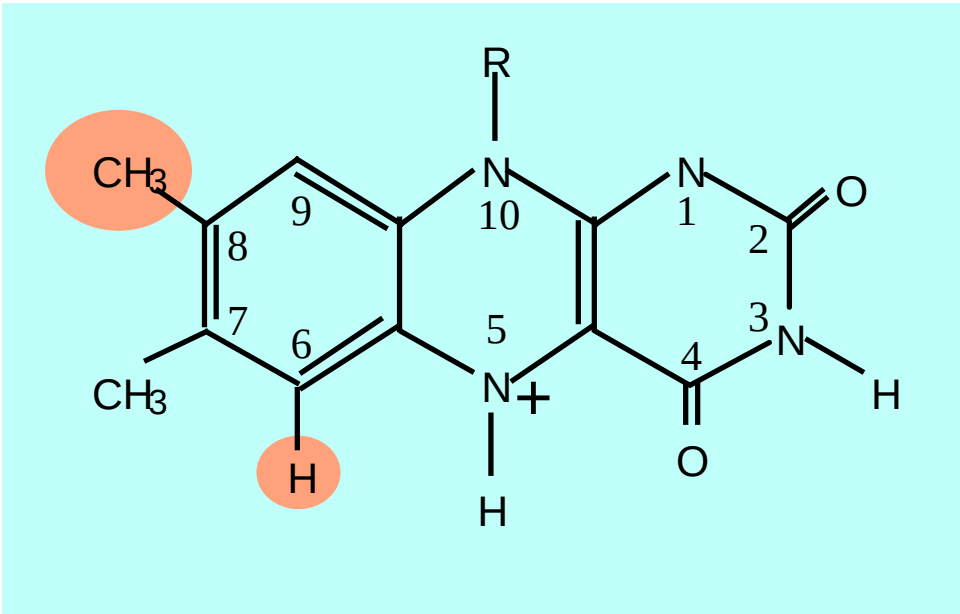
✓ Desdoblamientos resueltos el flavinas modelo

Técnicas avanzadas

Permiten la detección de desdoblamientos hiperfinos no resueltos

ENDOR (doble resonancia electrón-núcleo)



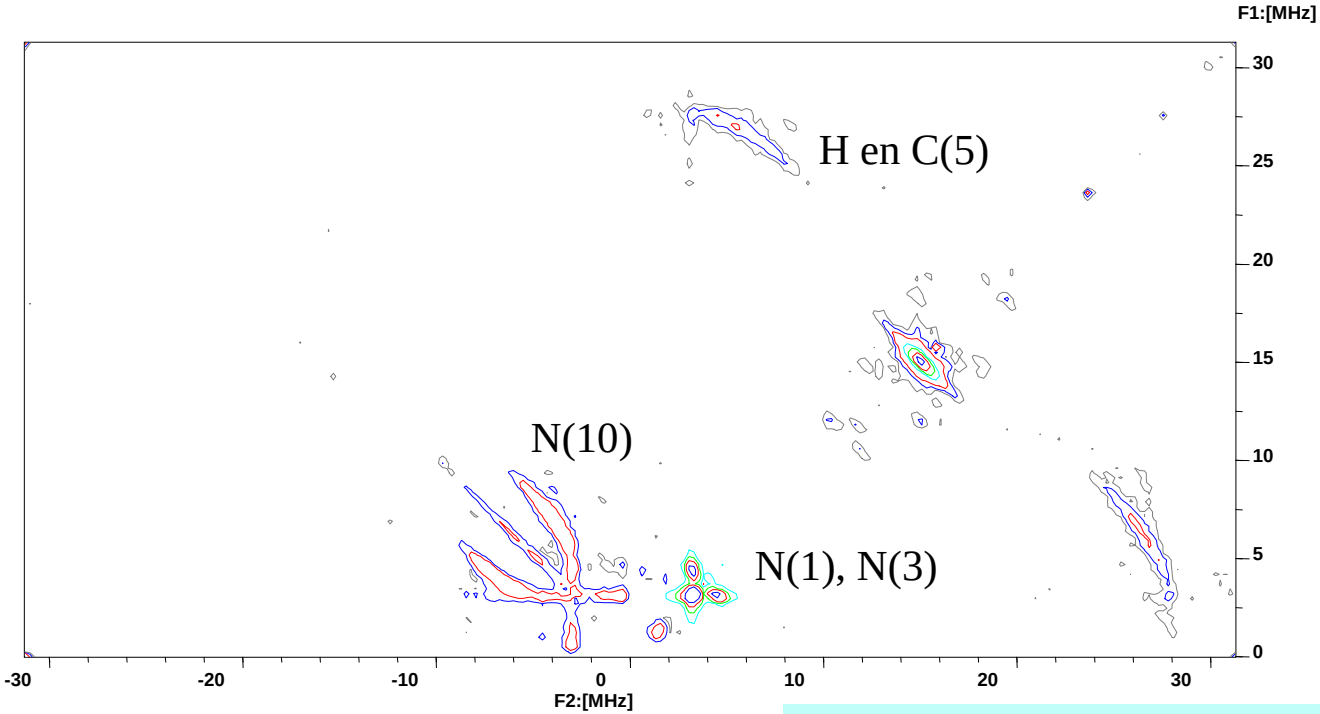


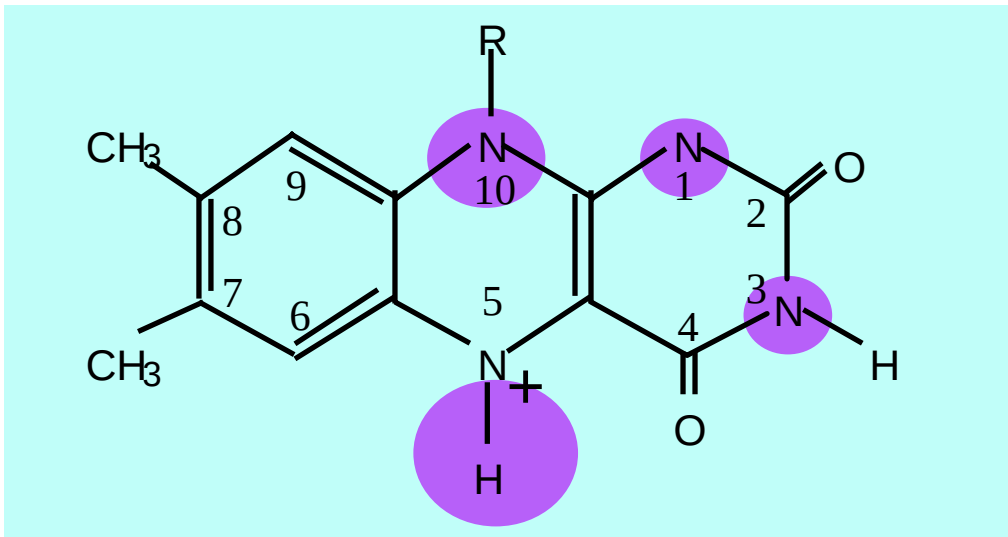
Acoplamientos Hiperfinos de Algunos Protones de la Flavina Obtenidos Mediante ENDOR

Flavoproteina semiquinona	$CH_3(8)$			CH(6)
			(± 0.1 MHz)	
	$A_{\perp}$	$A_{//}$	a	a
Flavodoxina	7.91	9.46	8.42	5.53
Ferredoxina-$NADP^+$ reductasa	7.47	9.41	8.12	5.11
Colesterol oxidasa	10.30	12.11	10.90	9.0

TÉCNICA DE EPR PULSADO ESEEM

ESEEM bidimensional: HYSCORE



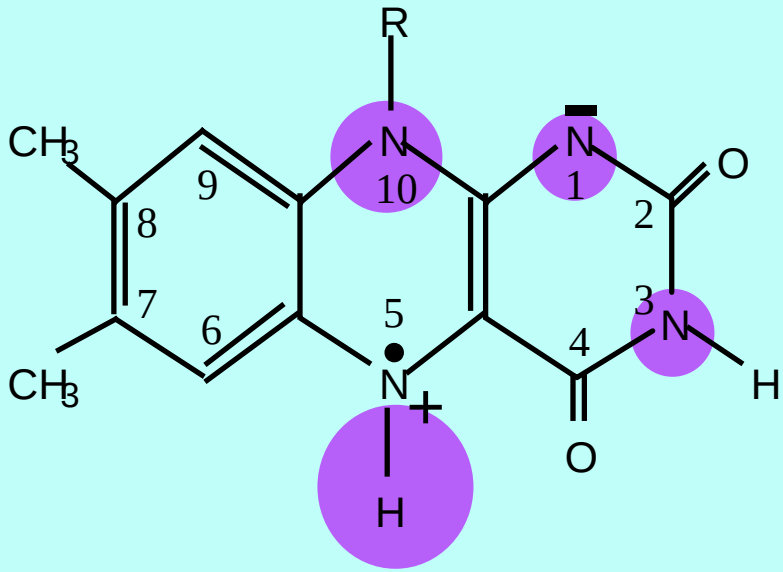


Parámetros de Interacción de los Núcleos ^{1}H y ^{14}N de la Isoaloxazina Obtenidos por HYSCORE

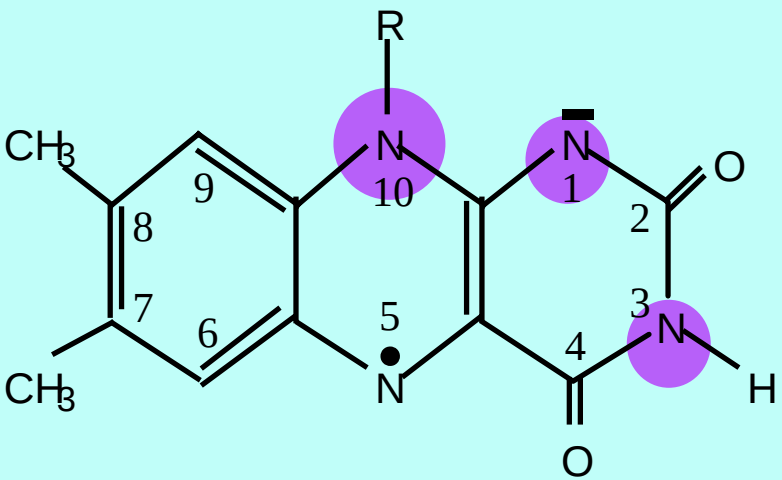
Flavoproteina semiquinona	Posición atómica	a (MHz)	T (MHz)	$K^2(3+\eta)$ (MHz^2)	η
Colesterol Oxidasa					
	H(5)				
	N(A)[a]	1.9 ± 0.2[b]	< 0.3	2.3 ± 0.2	0.5 ± 0.1
	N(B)[a]	0.7 ± 0.2[b]	< 0.3	2.1 ± 0.1	n.d.
	N(10)	11.7 ± 1.0	9.0 ± 1.1	n.d.	n.d.
FNR					
	H(5)	-18.7 ± 0.8	8.2 ± 0.4		
	N(A)[a]	1.2 ± 0.2[b]	< 0.3	2.2 ± 0.1	0.5 + 0.1[c]
	N(B)[a]	0.7 ± 0.3[b]	< 0.3	2.4 ± 0.2	n.d.
	N(10)	11.7 ± 1.0	9.0 ± 1.1	n.d.	n.d.
Flavodoxina					
	H(5)	-18.8 ± 0.6	8.7 ± 0.3		
	N(A)[a]	1.3 ± 0.3[b]	< 0.3	2.2 ± 0.1	0.5 ± 0.1[c]
	N(B)[a]	0.8 ± 0.2[b]	< 0.3	2.1 ± 0.1	n.d.
	N(10)	11.7 ± 1.0	9.0 ± 1.1	n.d.	n.d.

a Estos nitrógenos corresponden a N(1) o N(3) del anillo de flavina.
b Sólo se ha determinado el valor absoluto.
c Estimado de los datos obtenidos para colesterol oxidasa.

Posiciones del Anillo de Isoaloxazina en Flavoproteínas Caracterizadas Mediante ESEEM e HYSCORE

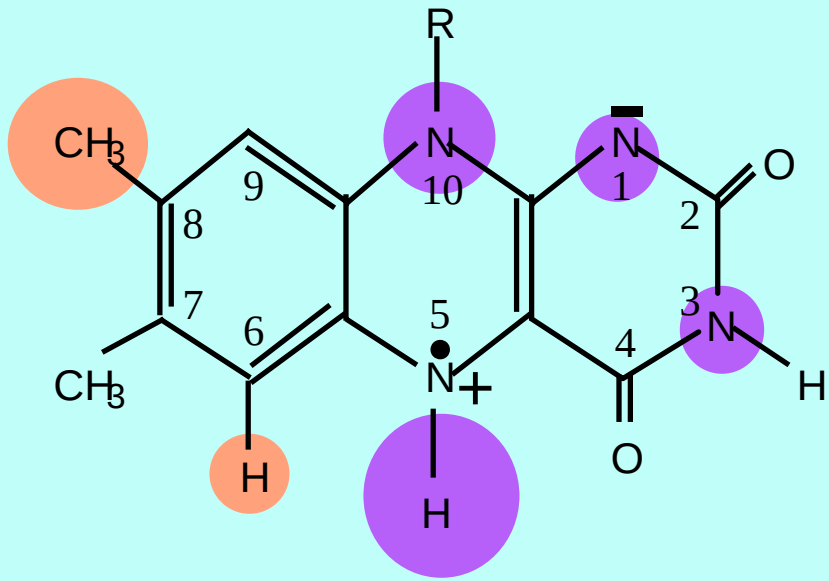


Semiquinona Neutra

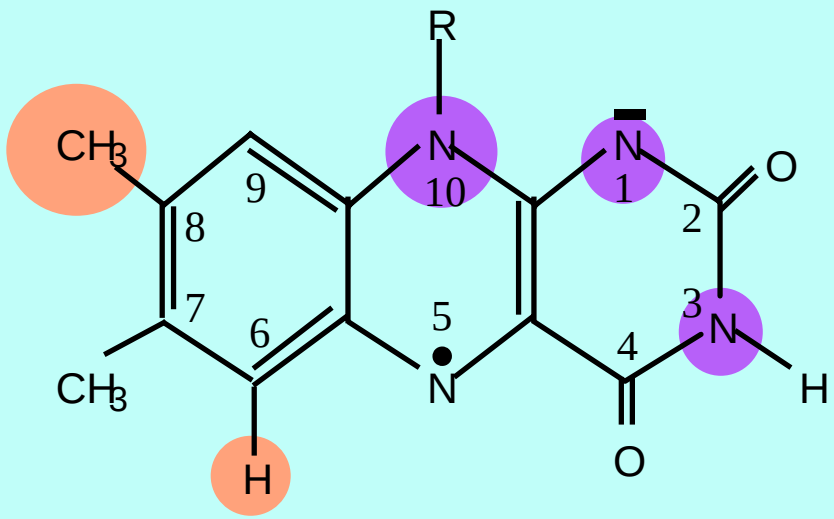


Semiquinona Aniónica

Posiciones del Anillo de Isoaloxazina en Flavoproteínas Caracterizadas Mediante ENDOR, ESEEM e HYSCORE



Semiquinona Neutra



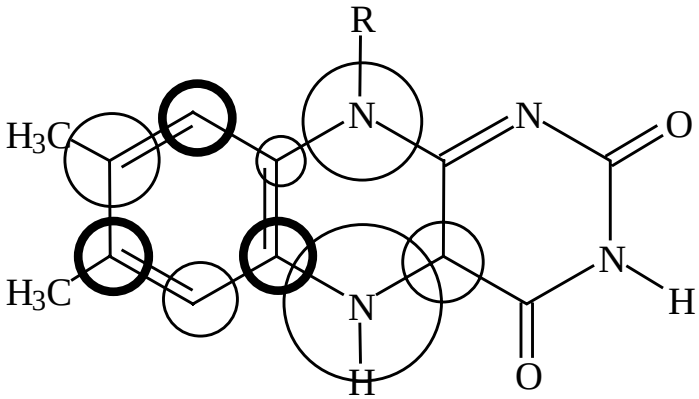
Semiquinona Aniónica

✓Mediante el uso combinado de las técnicas avanzadas de EPR ESEEM y ENDOR disponemos de un mapa del espín a través de las interacciones hiperfinas

✓Rasgos del mapa:

✓Elevada presencia del espín en el anillo central (“pirazinoide”), sobre todo en el N(5)

✓Moderada presencia en el anillo de la izquierda (“bencenoide”), y muy baja en el de la derecha (“pirimidinoide”)



Adaptado de D. E. Edmondson, “Electron-spin resonance studies on flavoenzymes”, *Biochem. Soc. Trans*. **13**, 593 (1985).

✓Uso del mapa: Elucidación del mecanismo de reacción (¿por dónde salta el electrón?)

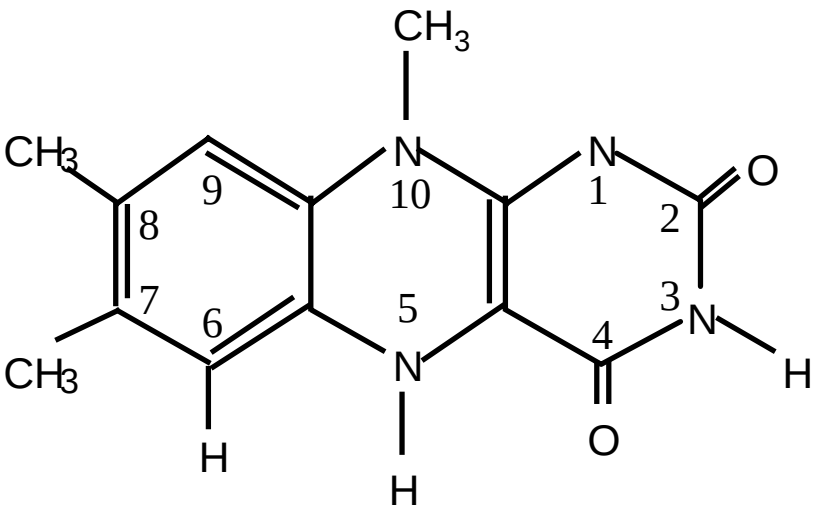
✓Sensibilidad al entorno en la proteína

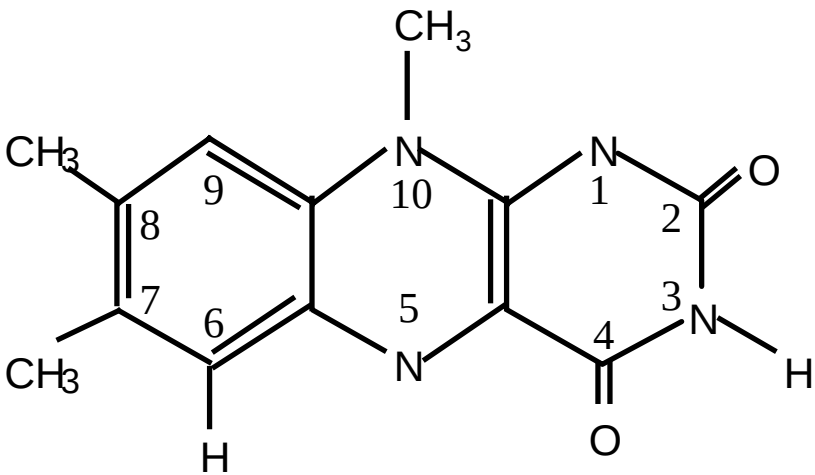
✓Efecto de la entrada del sustrato

CÁLCULOS CUÁNTICOS DE LA FLAVINA

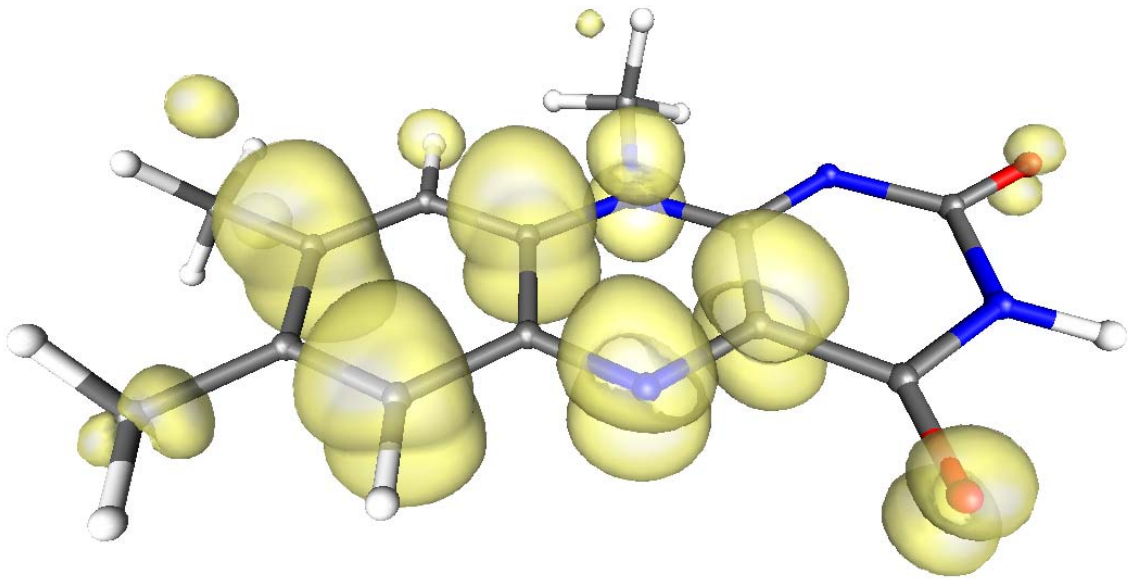
- ✓Programa Gaussian
- ✓Cálculo de la distribución de espín en el estado semiquinona (capa abierta)
- ✓Elección del funcional y de las bases de cálculo
- ✓Elección del sistema a calcular

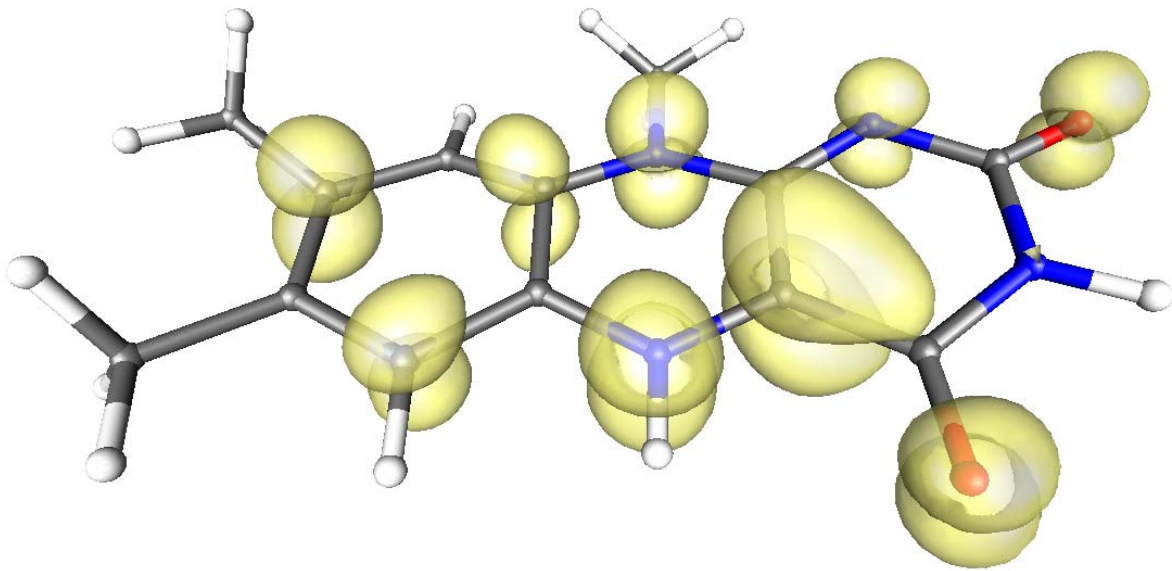
Lumiflavina, neutra y aniónica





Resultados de los cálculos para el orbital ocupado por el electrón desapareado





Comparación cálculos-experimentos

	Calculated Data				Experimental Data			
ATOM	*a* (MHz)	*T* (MHz)	K (MHz)	η	*a* (MHz)	*T* (MHz)	K (MHz)	η
H(5)	-21.4	11.0			-18.8	9.0		
H(6)	-6.4	2.1			-5.7	n.d.[b, c]		
H(met8)	9.1	0.6			8.4	0.5		
H(met10)	9.8	1.0			12.5[d]	1.15[d]		
N(1)	0.1	0.3	0.7	0.8	0.8[e]	n.d.[b]	0.8[e, f]	0.5[e, f]
N(3)	-1.0	0.3	0.8	0.2	1.3[e]	n.d.[b]	0.7-0.9[e]	n.d.[b]
N(5)	13.6	14.6	0.7	0.3	22.1[g]	-	-	-
N(10)	7.6	7.6	0.8	0.2	11.7	9.0	1.3[h]	-

Neutra

	Calculated Data				Experimental Data			
ATOM	*a* (MHz)	*T* (MHz)	K (MHz)	η	*a* (MHz)	*T* (MHz)	K (MHz)	η
H(6)	-11.3	2.7			-9.0	n.d.[b, c]		
H(met8)	13.9	0.6			10.9	0.6		
N(1)	0.7	1.1	0.7	0.8	0.7[d]	n.d.[b]	0.7-0.9[d]	n.d.[b]
N(3)	-1.3	0.1	0.8	0.2	1.9[d]	n.d.[b]	0.8[d]	0.5[d]
N(5)	16.0	17.4	0.7	0.3	20.4[e]	-	-	-
N(10)	8.2	5.2	0.8	0.2	11.7	9.0	1.3[f]	n.d.[b]

Aniónica

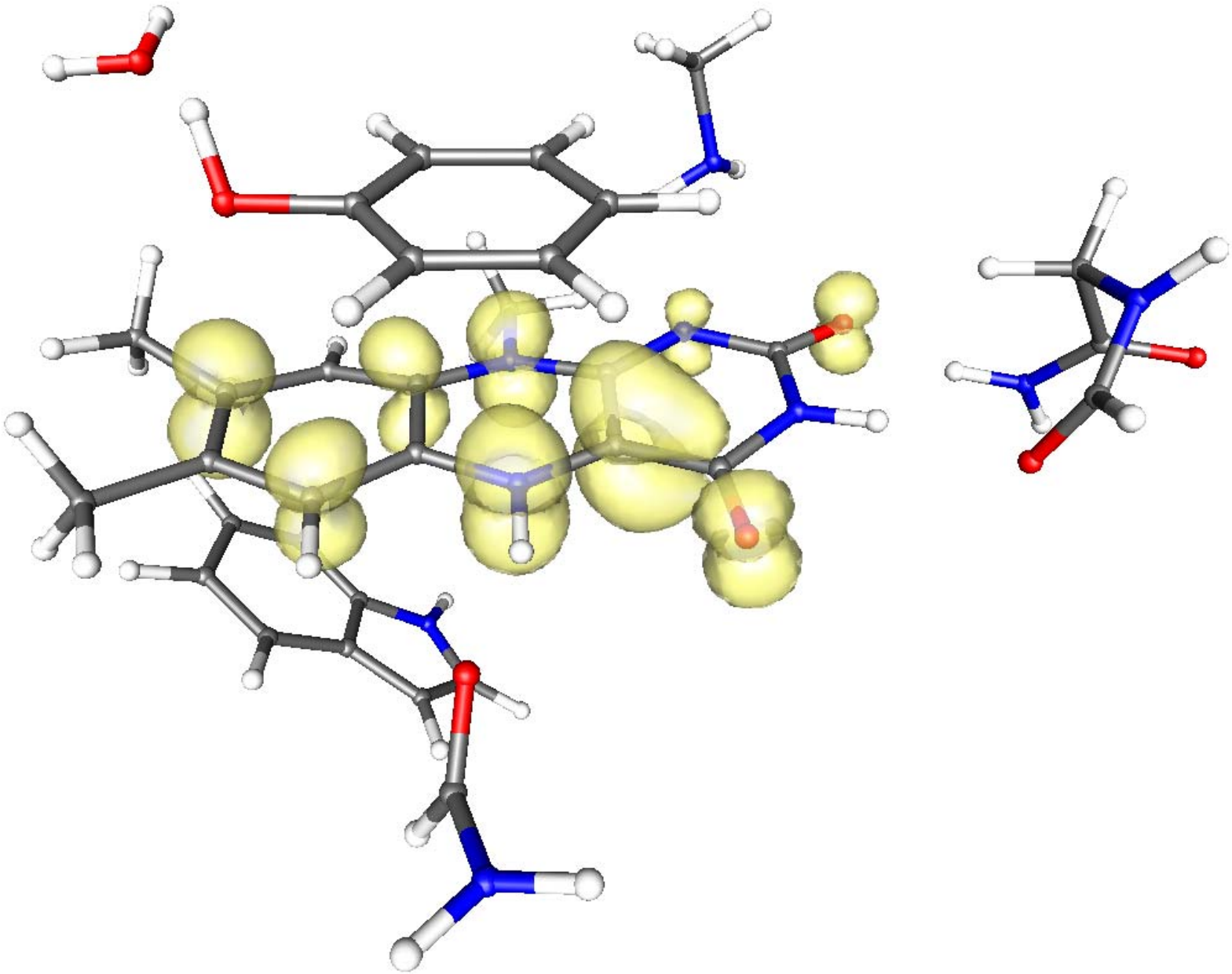
RESULTADOS DE LA COMPARACIÓN

- ✓Los cálculos reflejan bastante bien (desviación < 20%) los valores de desdoblamiento hiperfino, tanto la parte isótropa como la anisótropa
- ✓Los cálculos predicen correctamente las diferencias entre flavina neutra y aniónica

RESULTADOS ADICIONALES DEL CÁLCULO

- ✓El orbital ocupado por el electrón desapareado tiene un marcado carácter π.
- ✓Además de en los átomos con densidad detectada (a través de la interacción hiperfina), hay una elevada densidad de espín en O(2), O(4) y C(4a)

POSIBILIDADES DE LOS CÁLCULOS

- ✓Disponer del mapa completo de densidades de espín
- ✓Calcular el efecto del entorno del anillo dentro de la proteína

Resultados de los cálculos para el orbital ocupado por el electrón desapareado considerando el entorno (R-X)