

# Espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear (RMN)

Margarida Gairí,<sup>1</sup> Miguel Feliz<sup>1</sup> i Miquel Pons<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona

<sup>2</sup> Laboratori de RMN de Biomolècules, Departament de Química Orgànica, Universitat de Barcelona

Correspondència: Miquel Pons. RMN de Biomolècules, Edifici Modular, Parc Científic de Barcelona.

Carrer de Baldri Reixac, 10-12. 08028 Barcelona. Adreça electrònica: [mpons@ub.edu](mailto:mpons@ub.edu).

DOI: 10.2436/20.1501.02.158

ISSN (ed. impresa): 0212-3037

ISSN (ed. digital): 2013-9802

<http://revistes.iec.cat/index.php/TSCB>

Rebut: 16/10/2014

Acceptat: 08/11/2014

## Resum

La capacitat de la RMN per obtenir informació molecular a escala atòmica l'ha convertida en una poderosa tècnica en biomedicina i biotecnologia. Entre les seves aplicacions pot destacar-se, per exemple, la caracterització de productes naturals i sintètics i la identificació i quantificació de components individuals de barreges complexes, eines clau en les indústries farmacèutica o alimentària. A més és una tècnica molt valuosa en diagnòsi mèdica. Ens permet obtenir imatges de parts del cos humà (RMN d'imatge) per detectar tumors o lesions. Possibilita la identificació de metabòlits com a possibles biomarcadors de malalties específiques. Addicionalment s'utilitza en la determinació de l'estructura tridimensional, la dinàmica i el funcionament de les principals dianes terapèutiques: les proteïnes, i també en l'estudi de les interaccions entre aquestes dianes i els fàrmacs, punt clau en el desenvolupament i millora d'un medicament.

**Paraules clau:** qualitat alimentària, metabolòmica, estructura i dinàmica de proteïnes, disseny de fàrmacs.

## Introducció

El nom de *ressonància magnètica* o simplement *ressonància* ha esdevingut familiar com una prova mèdica utilitzada sovint per diagnosticar l'abast de les lesions dels esportistes o per detectar tumors. Aquests termes escurcen i fan menys temible per als malalts el nom original de *ressonància magnètica nuclear* o RMN. El terme *nuclear* no té res a veure amb la radioactivitat sinó que es refereix al fet que la RMN obté informació sobre els nuclis dels àtoms. Nosaltres, tots els animals i plantes i tots els objectes que ens envolten, estem formats per àtoms i cada àtom té el seu nucli. Els àtoms es poden agrupar en molècules: l'aigua està formada per tres àtoms (dos d'hidrogen i un d'oxigen); la sacarosa té de fórmula  $C_{12}H_{22}O_{11}$ , en què els subíndexs reflecteixen el nombre de cadascun dels tipus d'àtoms; la insulina, la proteïna que falta en alguns tipus de diabetis, està formada per 257 carbonis, 385 hidrògens, 65 nitrògens, 42 oxígens i 6 sofre. Aportant informació dels nuclis —i per tant dels àtoms— d'una molècula, la RMN ens permet saber la forma de les molècules, com es mouen, amb qui interaccionen i, per tant, entendre com funcionen i de quina manera es poden corregir, mitjançant els fàrmacs, disfuncions que causen malalties. Una variant de la RMN ens permet, a més, conèixer la localització de les molècules més abundants (aigua) dins del cos i això ens dona imatges que els metges poden interpretar per detectar tumors, lesions, etc. Aquesta variant de la RMN s'anomena *ressonància magnètica d'imatge* i és la *ressonància* que molts de nosaltres hem experimentat com a pacients.

**Una mica d'història.** El concepte de *espín*, una nova propietat de

## Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy

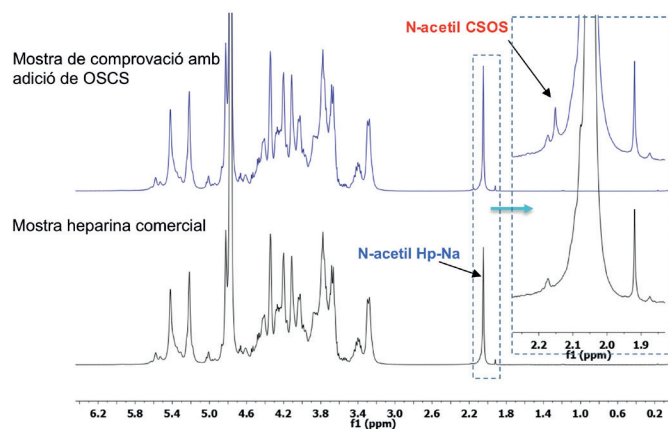
### Summary

NMR has become a powerful technique in biomedicine and biotechnology because of its ability to provide molecular information at atomic level. Among its many applications, we highlight its use for natural products characterization and the identification and quantification of individual components of complex mixtures in the pharmaceutical or food industries. NMR is a potent tool in medical diagnosis as well. Body images obtained through nuclear magnetic resonance imaging (NMRI) inform of the presence of tumours or injuries, and metabolites can be identified as specific disease-related biomarkers. In addition, NMR provides advantages in determining the structure, dynamics and function of drug targets such as proteins, and it can characterize drug-target interactions, which are critical to the drug discovery process.

**Keywords:** food quality control, metabolomics, protein structure and dynamics, drug discovery.

les partícules elementals (a més de la seva massa o càrrega), s'havia predit i trobat en el cas dels electrons i Stern el 1933 va demostrar que el protó, que forma el nucli de l'àtom d'hidrogen, també tenia espín. Això li va valdre el Premi Nobel de física de l'any 1943. L'any següent Rabi rebia el Premi Nobel pel descobriment del mètode de ressonància per detectar-lo. La predicció era que les partícules amb espín havien de respondre a la presència de camps magnètics intensos i adquirir la propietat d'absorbir (i després tornar a emetre) ones de ràdio que complissin una determinada condició anomenada *ressonància*. El 1946 els grups de Bloch, a Stanford, i de Purcell, a Harvard, demostraven que es podia mesurar la ressonància magnètica nuclear de mostres massives (parafina, aigua, etanol). Tots dos van compartir el Premi Nobel de Física del 1952. Molt aviat es va demostrar que les implicacions d'aquests descobriments, primer en el camp de la química i després en els de la biologia i la medicina, eren immenses. Els premis Nobel de Química de 1991 (Ernst) i 2002 (Wüthrich) i el de Medicina o Fisiologia del 2003 (Lauterbur i Mansfield) en donen testimoni.

El discurs de concessió del Premi Nobel de 1946 descriu de manera poètica i profètica la rellevància i l'impacte de la RMN: «Dr. Bloch i Dr. Purcell! Heu obert el camí cap a noves perspectives en el micromón de la física nuclear. Cada àtom és com un subtil i refinat instrument tocant la seva tènue melodia magnètica que l'oïda humana no pot copsar. Amb els vostres mètodes, aquesta música s'ha fet perceptible i la melodia característica de cada àtom es pot utilitzar per identificar-lo. Més enllà de la seva gran bellesa intel·lectual, aquest descobriment posa a les mans dels científics un mètode analític de la més gran utilitat.»



↑ Figura 1. Espectres de  $^1\text{H}$  d'heparina amb CSOS i d'heparina comercial.

**Les capacitats de la RMN: les molècules àtom a àtom.** La freqüència de ressonància de cada nucli («el to de la melodia») depèn no tan sols del tipus de nucli sinó també del seu entorn. Així, els vint-i-dos hidrògens de la molècula de sacarosa poden ser distingits entre si. La complexa melodia d'aquest cor de vint-i-dues veus es pot separar per extreure'n cada una de les contribucions per mitjà d'un procés anomenat *transformada de Fourier*. El resultat és un espectre de RMN, que conté les freqüències associades a cadascun dels nuclis observats. L'anàlisi dels espectres de RMN ens indica, per a cada nucli d'hidrogen, a quins àtoms està unit, quins altres hidrògens té a prop, com d'exposat està al dissolvent (aigua) que envolta la molècula de sacarosa, com giren les parts de la molècula unides per enllaços senzills i quines orientacions relatives assumeixen. Si no sabéssim de quina molècula es tracta, aquesta informació ens permetria identificar-la. Si ja ho sabem, ens permet conèixer l'estructura i la dinàmica, que determinen i expliquen les seves propietats.

## Aplicacions

**Caracterització de molècules i barreges complexes.** La RMN ha esdevingut una de les tècniques més potents per determinar l'estructura de productes naturals i sintètics. La seva sensibilitat a petites modificacions estructurals i també la capacitat de quantificar la presència de components individuals de barreges sense separar-los físicament ha fet de la RMN una eina molt important per a la caracterització de productes complexos. En alguns casos, és el procediment analític obligat per les farmacopeces i la FDA, com en l'anàlisi de l'heparina sòdica. El 2008 es va detectar un increment de les reaccions al·lèrgiques dels pacients tractats amb heparina, a causa d'una adulteració amb sulfat de condroitina persulfat (CSOS). Tot i que l'heparina té un elevat pes molecular i una gran heterogeneïtat, en els espectres de protó (vegeu la figura 1) és possible distingir la presència del senyal de baixa intensitat corresponent al N-acetil del CSOS a 2,17 ppm diferenciat dels acetils dels components principals (2,10-2,04 ppm).

**Alimentació.** Cada vegada és més necessari verificar la identitat i qualitat del producte, disposar d'informació per assegurar-ne la traçabilitat i prevenir possibles frauds. La RMN reuneix els requisits necessaris per fer anàlisis d'aliments a gran escala: mínima manipulació de la mostra,

alta reproductibilitat, resultats qualitius i quantitius fàcils d'obtenir i baix cost per mostra.

Un exemple és l'aplicació a l'anàlisi de vins. Els seus espectres de RMN de protó ( $^1\text{H}$ ) mostren una gran complexitat, però utilitzant experiments en els quals es detecten simultàniament parelles de nuclis relacionats entre si (per exemple, perquè estan enllaçats entre si), es poden identificar fins a uns quaranta compostos orgànics (aminoàcids, hidroxiàcids, àcids orgànics, sucres, polifenols, etc.). Aquests experiments s'anomenen *bidimensionals* o 2D, en referència al nombre de nuclis que correlacionen, i poden ser homonuclears (per exemple,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) o heteronuclears (per exemple,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ). El  $^{13}\text{C}$  és un isòtop del carboni que té una abundància natural d'un 1 % —l'isòtop més abundant del carboni ( $^{12}\text{C}$ ) no és observable en RMN. Des del punt de vista pràctic, les mostres requereixen una mínima manipulació: l'addició d'una petita quantitat (10-15 %) d'aigua deuterada i d'un compost de referència. En el moment d'adquirir els espectres cal minimitzar el senyal de les molècules més abundants (aigua i etanol) per poder detectar millor els compostos minoritaris. Aquesta capacitat de no-observació selectiva d'alguns senyals és el resultat de l'aplicació del que s'anomenen *seqüències de polsos* i il·lustra la versatilitat de la RMN, que permet dissenyar experiments optimitzats per a problemes específics. La figura 2 mostra els espectres de protó de diferents vins negres, en els quals ja s'observa una diferent empremta dactilar, conseqüència de la diferent evolució i procedència de cadascun. La disponibilitat de bases de dades de RMN facilitarà en el futur el tractament de les dades mitjançant l'anàlisi estadística multifactorial, per obtenir informació sobre l'anyada, composició de most, regió geogràfica, perfil del productor, influència del territori, i en últim extrem la detecció d'anomalies. Una altra alternativa és obtenir un perfil de components (anàlisi dirigida), amb identificació i quantificació del major nombre possible dels compostos orgànics presents. D'aquesta manera es poden seguir els processos de fermentació o bé determinar la presència d'additius (Spraul, 2013).

**Medicina i salut.** La RMN és una tècnica no invasiva. El fet d'observar la molècula no en canvia el comportament i el procés d'adquisició d'un espectre de RMN té un risc mínim per a la salut. Aquesta innocuïtat ha permès el desenvolupament de la ressonància com a eina de diagnòstic mèdic. En aquest àmbit d'aplicació, a més de les imatges anatòmiques, també es poden distingir els diferents metabòlits i fins i tot seguir-ne les transformacions en temps real. Aquesta branca de la biomedicina es coneix com a *metabolòmica*.

La identificació i quantificació dels metabòlits proporciona una valuosa informació sobre l'estat funcional dels sistemes biològics. Potencialment aquesta informació pot ser utilitzada per detectar malalties, fins i tot en un estat incipient, ja que les alteracions comporten modificacions en el sistema biològic implicat. La RMN es pot aplicar amb una mínima manipulació a mostres procedents de qualsevol tipus de fluid biològic (orina, sang, saliva, etc.). Per a la identificació dels components individuals es recorre a experiments multidimensionals i a la comparació amb bases de dades. En altres casos es comparen directament els espectres amb els de mostres de referència utilitzant mètodes estadístics sofisticats que aconseguen associar certes característiques espectrals amb trets mèdicament rellevants que poden ajudar els metges a diagnosticar malalties. Actualment la metabolòmica s'utilitza extensament en estudis preclínic, d'identificació de toxicitat i per a la detecció de nous biomarcadors. Així, la RMN ha estat utilitzada per identificar biomarcadors potencials en la malaltia d'Alzheimer en ratolins, per de-

tectar una reducció del N-acetil-L-aspartat abans que es manifestessin els símptomes clínics.

La metabolòmica basada en RMN presenta també un elevat potencial de desenvolupament en l'anomenada medicina personalitzada, mitjançant la determinació dels perfils metabòlics i de la seva modificació en funció de l'evolució del pacient i del tractament amb fàrmacs (Palmnas *et al.*, 2013).

La RMN no solament es limita a l'estudi de mostres de fluids sinó que pot ser aplicada a l'estudi de teixits, mitjançant l'aplicació de l'HRMAS (*high resolution magic angle spinning*). Aquesta tècnica es basa a fer girar les mostres a velocitats relativament altes al voltant d'un eix inclinat  $54,74^\circ$  (l'anomenat *angle màgic*) respecte a la direcció del camp magnètic. Un exemple de l'aplicació són els estudis recents destinats a trobar noves eines per predir la supervivència en càncer colorectal a través de la identificació i quantificació de trenta metabòlits (Pacholczyk-Sienicka *et al.*, 2014).

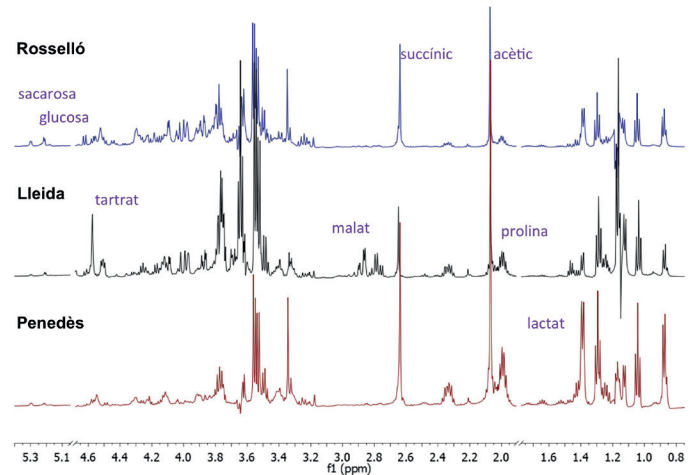
**Estudi de proteïnes.** En l'estudi d'aquestes macromolècules resulta útil enriquir la mostra amb  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$ , isòtops estables però amb una baixa abundància natural (aproximadament 1 % per al  $^{13}\text{C}$  i 0,4 % per al  $^{15}\text{N}$ ). Per enriquir les proteïnes s'utilitzen tècniques de biologia molecular per aconseguir produir-les en bacteris, els quals es fan créixer en medis de cultiu on les seves fonts de carboni i nitrogen estan formades únicament pels isòtops pesants.

Hi ha dos tipus d'espectres que ens aporten informació qualitativa sobre com són les proteïnes: l'espectre de  $^1\text{H}$  i els mapes de correlació  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (vegeu la figura 3), que mostren un senyal per a cada parella de HN. A la cadena principal d'una proteïna, cada aminoàcid té un grup HN, exceptuant les prolines. Per tant, cada pic d'un mapa de correlació  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  correspon a un residu diferent. Aquests espectres ens permeten saber si una proteïna està plegada o no, si està agregada o té tendència a agregar, ens informen sobre la seva estabilitat temporal i fins i tot poden revelar la presència de processos dinàmics. Per exemple, en una proteïna ben plegada els entorns de cadascun dels residus és molt diferent i els senyals corresponents estaran dispersos per l'espectre (vegeu les figures 3a, b). En canvi, les proteïnes desplegadas mostren una dispersió molt menor, conseqüència dels entorns químics més similars en què es troben els protons (vegeu les figures 3c, d).

Actualment, es requereixen concentracions de proteïna de l'ordre de 0,5 mM i volums de mostra al voltant de 0,6 ml per poder abordar un estudi estructural d'una proteïna de mida moderada per RMN (20 kDa).

Com més grans són les proteïnes més difícil resulta estudiar-les per RMN. En augmentar el nombre d'àtoms els espectres són més complexos. La mida de la molècula també afecta la manera com gira sobre ella mateixa. Les molècules més grans es mouen i giren més lentament que les més petites i la RMN és sensible a aquest moviment global. Una de les conseqüències pràctiques és que els senyals de RMN de les molècules grans són més amplis i això té conseqüències en la resolució (capacitat de distingir dos senyals com a diferents quan estan un a prop de l'altre en l'espectre) i la sensibilitat (els senyals amplis són també menys intensos i costa més distingir-los del soroll de fons).

L'ús d'imants cada cop més potents (fins a 23,5 T, que correspon a una freqüència de protó de 1.000 MHz), sistemes de detecció més sensibles, i seqüències de polsos que permeten obtenir senyals més estrets, han fet possible que actualment es puguin resoldre estructures de proteïnes fins a 40-50 kDa de manera relativament rutinària.

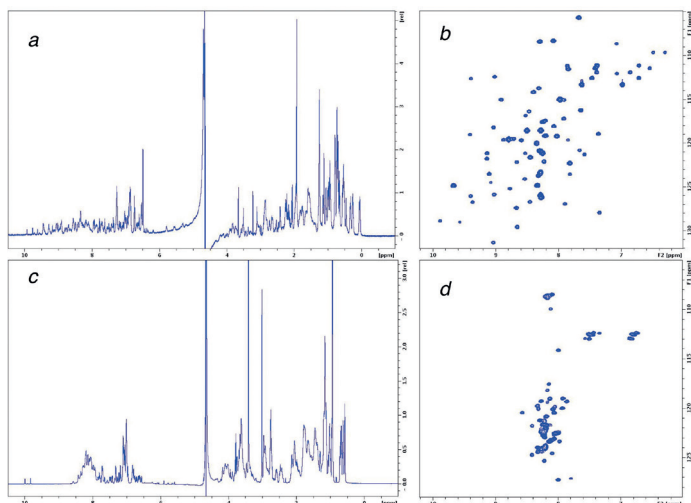


↑ Figura 2. Espectres de  $^1\text{H}$  de tres mostres de vi negre.

**Determinació de l'estructura de proteïnes.** L'estudi per RMN d'una proteïna comença sempre per l'assignació de l'espectre. Això vol dir esbrinar a quin aminoàcid de la proteïna correspon cada senyal del mapa de correlació  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ . El procés és més complex com més gran és la proteïna. La utilització d'altres nuclis com el  $^{13}\text{C}$ , a part de  $^1\text{H}$  i  $^{15}\text{N}$ , és essencial en les estratègies modernes d'assignació que es basen en l'ús d'espectres de correlació que impliquen els nuclis de  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  i  $^{13}\text{C}$ . Habitualment s'utilitzen espectres de tres dimensions (en què es correlacionen grups de tres nuclis). Aquests experiments connecten àtoms situats dins del mateix residu o en residus veïns (vegeu la figura 4a). Els carbonis carbonílic (C=O) i alfa ( $\text{C}^\alpha$ ) són els punts de connexió entre els grups amida d'aminoàcids consecutius, mentre que els carbonis beta ( $\text{C}^\beta$ ) ajuden a distingir les cadenes laterals dels diferents aminoàcids. Es tracta d'identificar fragments de residus consecutius i comparar-los amb la seqüència d'aminoàcids de la proteïna (que ja coneixem), fins a completar l'assignació de tots els senyals. El procés recorda la resolució d'un trencaclosques.

Un cop assignades les freqüències dels diferents nuclis podem determinar l'estructura tridimensional de la proteïna, és a dir, conèixer la disposició relativa d'àtoms o regions de la proteïna allunyades en la seqüència d'aminoàcids però properes en l'espai, a causa del plegament mateix de la proteïna. Per a això utilitzem experiments de RMN que identifiquen aquells parells de protons (a través dels seus senyals assignats) que estiguin separats com a màxim una distància de 5 Å. Aquesta informació representa un conjunt de restriccions que ha de complir un model que representi correctament el plegament de la proteïna. L'estructura de la proteïna s'obté a través d'un programa de dinàmica molecular, en què s'han incorporat aquestes restriccions estructurals. La determinació estructural de proteïnes per RMN està descrita amb detall en un treball previ de TREBALLS DE LA SOCIETAT CATALANA DE BIOLOGIA (Contreras *et al.*, 1998).

Recentment s'ha estès la utilització de marcatges selectius per observar només alguns àtoms de la macromolècula. Això simplifica els espectres i la informació que se'n deriva de manera molt significativa. Les «sondes» més usades són els grups metil marcats amb  $^{13}\text{C}$  ( $^{13}\text{C}\text{H}_3$ ) de les cadenes laterals dels aminoàcids leucina, isoleucina, valina i metionina. Aquests metils presenten unes propietats espectroscòpiques òptimes, solen estar ubicats en els nuclis hidrofòbics de les proteïnes o en les



.....  
 † **Figura 3.** Espectres de  $^1\text{H}$  (a) i de correlació  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (b) d'una proteïna plegada (domini SH3 de la proteïna c-Src). Espectres de  $^1\text{H}$  (c) i de correlació  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (d) d'una proteïna intrínsecament desordenada o desplegada (domini únic de la proteïna c-Src).  
 .....

interfases dels complexos biomolèculars i actuen com a «espies» molt eficaços per esbrinar l'estructura i dinàmica de la proteïna.

**Dinàmica de proteïnes: molècules en funcionament.** La RMN és gairebé l'única tècnica que permet, de manera general, estudiar la mobilitat interna de les molècules en dissolució en una àmplia escala de temps, és a dir, seguir canvis de l'entorn dels nuclis que duren des dels nanosegons fins a les hores. En el cas de molècules biològiques, els estudis es poden fer en les condicions naturals (dissolució aquosa) i permeten estudiar l'escala de temps en la qual tenen lloc els processos vitals en què participen com la catàlisi de les reaccions bioquímiques per enzims.

Fins i tot per a grans complexos moleculars, la RMN permet quantificar les fluctuacions conformacionals que acompanyen l'activitat biològica de les proteïnes i que poden ocórrer en uns pocs piconsegons, microsegons o mil·lisegons, o bé en hores o fins i tot en dies (Mittermaier i Kay, 2009). Un nucli en una proteïna que experimenta un bescanvi entre dues conformacions diferents pot presentar un, dos o cap senyal en un espectre de RMN, en funció de la velocitat de bescanvi i de com de diferents siguin les freqüències de ressonància (per tant, l'entorn químic) d'aquest nucli en els dos estats conformacionals. A velocitats baixes de bescanvi s'observarien dos senyals, un per a cada estat. A velocitats altes s'observa un únic senyal situat a mig camí. A velocitats intermèdies els senyals s'eixamplen (fins i tot poden desaparèixer).

Un exemple rellevant de l'aportació de la RMN a l'estudi del funcionament d'un complex macromolecular és el proteasoma (Sprangers *et al.*, 2007; Religa *et al.*, 2010). Aquesta gran màquina molecular té un paper central en l'homeòstasi cel·lular. La partícula central del proteasoma, de 670 kDa, presenta una estructura cilíndrica —determinada per raigs X— i consta de quatre anells. Cada anell està format per set monòmers idèntics de 21 kDa de dos tipus diferents ( $\alpha$  o  $\beta$ ). Els anells s'apilen formant un cilindre en aquest ordre:  $\alpha, \beta, \beta, \alpha$ , (vegeu la figura 4b). L'accés dels substrats al proteasoma té lloc a través dels anells  $\alpha$ , mentre que la cambra catalítica es troba ubicada entre els dos anells  $\beta$ . Per RMN s'ha observat que la regió del complex que dona accés als substrats és molt flexible. Està constituïda per un petit nombre de residus, situats

als extrems N-terminal dels set monòmers  $\alpha$  de l'anell. Els espectres de correlació  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  de mostres etiquetades selectivament amb  $^{13}\text{C}$  en els metils de metionina van demostrar la presència d'almenys dos pics per a cadascuna de les metionines d'aquesta regió. Mitjançant experiments de bescanvi es va determinar que aquests pics corresponien a dues formes, una de tancada, en la qual l'accés del substrats a l'interior del proteasoma està limitat (D), i una d'oberta, que permet aquest accés (F), vegeu la figura 4b. La interconversió entre aquests dos estats, en l'escala de temps dels segons, és el mecanisme que controla l'entrada del substrat en el proteasoma per a la degradació posterior, mentre que les poblacions relatives d'aquests dos estats sembla que determinen la velocitat de proteòlisi. La comprensió de la dinàmica d'accés al proteasoma obre la possibilitat de regular-ne la funció, per exemple amb el disseny de fàrmacs que puguin alterar la dinàmica del bescanvi entre els dos estats conformacionals majoritaris.

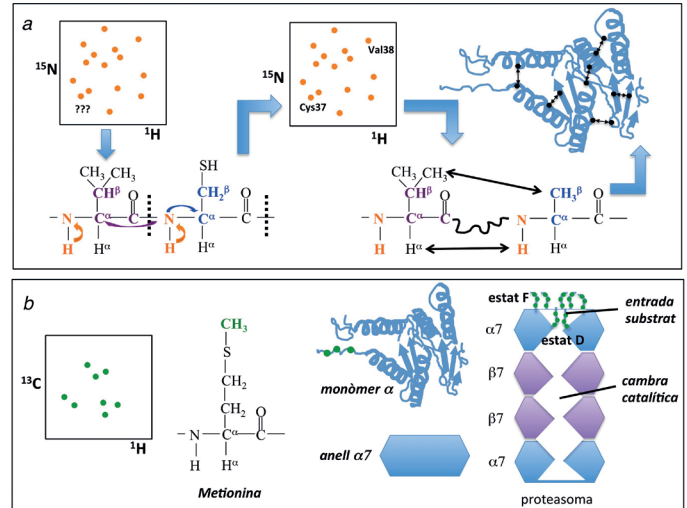
**Proteïnes desordenades i càncer.** Fins fa pocs anys només les proteïnes plegades eren objecte d'estudi en biologia estructural. Darrerament també ho són les anomenades *proteïnes intrínsecament desordenades*. S'ha descobert que tenen un paper clau en la regulació de processos essencials en organismes superiors. Per exemple, el 80 % de les proteïnes implicades en càncers humans tenen grans regions desordenades. La RMN és l'única tècnica amb resolució atòmica que permet l'estudi de les proteïnes desordenades. Un exemple interessant d'aplicació en aquest camp és l'estudi d'un domini de la proteïna c-Src, una cinasa involucrada en moltes rutes de senyalització cel·lular. S'ha detectat que l'anomenat «domini únic» d'aquesta cinasa, intrínsecament desordenat, presenta unions secundàries amb els lípids de la membrana cel·lular i és capaç de modular la unió d'altres dominis plegats de la proteïna amb la membrana, fet que representa el descobriment d'un nou mecanisme de regulació de l'activitat d'aquest enzim (Pérez *et al.*, 2013). La capacitat oncogènica de la c-Src està lligada a defectes en la seva regulació, de manera que qualsevol avenç en la comprensió d'aquests mecanismes reguladors obre la porta a noves estratègies de lluita contra el càncer.

**Descobriments de fàrmacs.** La formació de complexos estables entre molècules petites (fàrmacs) i proteïnes és freqüentment responsable de la seva funció com a medicaments.

Els nuclis que formen part de la molècula lliure i del complex sovint ressonen a freqüències diferents i, per tant, es poden distingir per RMN. Així, a partir d'una col·lecció de compostos («quimioteca») és possible identificar aquells que interaccionen amb la proteïna d'interès. Per a la cerca de nous fàrmacs hi ha dues grans estratègies: la cerca de molècules complexes que directament s'uneixin a la seva diana amb alta afinitat o el disseny d'aquestes molècules a partir del coneixement de la capacitat d'unió a la diana, encara que sigui amb baixa afinitat, de petits fragments. La primera estratègia requereix grans quimiotèques i s'anomena, en anglès, *high-throughput screening* (HTS). És una alternativa poc eficient i costosa, ja que requereix l'exploració d'un nombre molt elevat de molècules. Els compostos prototip obtinguts sovint no tenen interaccions òptimes, ja que hi haurà parts de la molècula que no estan involucrades en la interacció amb el receptor.

L'altra alternativa, més utilitzada actualment, s'anomena *fragment based drug discovery* (FBDD), i es basa en la recerca de quimiotèques més reduïdes amb compostos de baix pes molecular (9-20 àtoms diferents de protó) que interaccionin dèbilment amb la diana terapèutica seleccionada. Posteriorment, sobre aquestes molècules es fan modifica-

→ **Figura 4.** a) Esquema de la determinació estructural de proteïnes per RMN. 1) Identificació dels espins («assignació») mitjançant experiments de correlació de tres espins ( $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  i  $^{13}\text{C}$ ). Cada grup amida ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ) presenta correlacions amb els carbonis del seu propi aminoàcid (color blau) i també amb els carbonis de l'aminoàcid veí (color lila). 2) Derivació de restriccions estructurals: sobretot distàncies (fletxes negres) entre protons assignats (punts negres). 3) Càlcul de l'estructura 3D amb programes de dinàmica molecular que incorporen les restriccions estructurals derivades per RMN. b) Estudi per RMN d'un complex macromolecular de 670 kDa: el proteasoma. S'usen com a sonda els grups metil ( $^{13}\text{C}$ ) de les tres metionines ubicades a l'extrem N-terminal de cada monòmer  $\beta$  (punts verds). Els mapes de correlació  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  presenten almenys dos senyals per a cada metionina. Experiments de bescanvi han posat de manifest l'existència d'un bescanvi conformational entre dos estats (D: cap a dins del proteasoma /F: cap a fora del proteasoma). La interconversió D/F, que té lloc en segons, és la responsable de la regulació de l'entrada dels substrats al proteasoma.



cions, o bé es combinen diversos fragments fins a obtenir una estructura química amb més afinitat, que es pugui utilitzar com a punt de partida en el desenvolupament de fàrmacs.

Per detectar les interaccions es pot observar la proteïna o el lligand potencial. Quan s'observa la proteïna cal haver assignat prèviament el seu espectre de RMN. En aquests estudis es comparen els espectres en presència i en absència de lligand per veure si hi ha canvis i identificar els residus afectats. Amb aquest mètode es poden localitzar lligands amb un ampli rang d'afinitats amb constants de dissociació ( $K_d$ ) de mM a nM.

Una altra possibilitat és observar els canvis que es produeixen sobre el lligand que s'uneix a la proteïna (mobilitat, amplada dels senyals). En aquest cas la proteïna no cal que estigui marcada ni disposar prèviament d'un coneixement detallat de l'estructura; tampoc no hi ha una limitació quant a la mida. Típicament, s'observa l'espectre d'una barreja de molècules petites en presència i en absència de proteïna per tal d'identificar aquelles que s'hi uneixen. Aquests experiments inclouen un filtratge dels espectres, de manera que únicament apareixen senyals de les molècules que interaccionen. S'han desenvolupat experiments de RMN que permeten amplificar els efectes, especialment quan les interaccions són febles (Mayer i Meyer, 1999; Dalvit *et al.*, 2000).

## Els reptes

**Molècules més grans, mostres més petites.** Les limitacions més grans de la RMN són la seva baixa sensibilitat a l'hora de mesurar els espectres i la mida màxima de les molècules que poden ser estudiades. Totes dues fronteres es van eixamplant contínuament amb els avenços de la tècnica. La baixa sensibilitat es compensa mesurant repetidament i sumant els espectres. La capacitat de distingir un senyal real del soroll de

fons augmenta amb l'arrel quadrada del nombre d'espectres acumulats. Així, si s'aconsegueix augmentar la sensibilitat un factor de 100, l'estalvi de temps és de 10.000. És a dir, un experiment que podria necessitar un any d'acumulació contínua, es podria fer en 50 min. Tècniques com l'anomenada *polarització nuclear dinàmica* ja permeten aquests guanys.

L'altra barrera, la de la mida de les molècules, està associada principalment a la seva baixa velocitat de reorientació en dissolució, que és el medi en el qual s'adquireixen la majoria dels espectres. Actualment, la RMN de sòlids ha emergit poderosament tant en el camp de la biologia molecular com en el de la ciència dels materials. En les mostres sòlides no hi ha reorientació i s'utilitzen altres tècniques per poder observar els espectres i, per tant, la mida de les molècules, en si mateixa, no representa un límit (encara que la complexitat dels espectres continua essent una limitació).

En eliminar el requisit de que les molècules estiguin dissoltes s'ha obert tot un nou món d'aplicacions: les proteïnes que formen les plaques amiloides associades a l'Alzheimer, les proteïnes de membrana que constitueixen la majoria dels punts d'actuació dels fàrmacs actuals. En el camp dels nous (i vells) materials, els grups capdavanter utilitzen la RMN per optimitzar les piles que alimentaran els cotxes elèctrics, els superconductors que permetran utilitzar l'energia cada vegada més cara de manera molt més eficient o els catalitzadors que s'utilitzen en la indústria per fer reaccions químiques més eficients i més netes. En els pocs més de cinquanta anys d'història de la RMN els desenvolupaments tècnics han respost a les demandes de les aplicacions existents però han obert nous camps d'aplicació abans considerats inabastables. No sembla que aquesta tendència s'aturi. La imaginació dels investigadors encara marca les fronteres de la RMN.

## Bibliografia

- CONTRERAS, M. A. [et al.] (1998). «Estructura i dinàmica en pèptids i proteïnes: la visió de la ressonància magnètica nuclear». *Treb. Soc. Cat. Biol.*, 48: 25-45.
- DALVIT, C. [et al.] (2000). «Identification of compounds with binding affinity to proteins via magnetization transfer from bulk water». *J. Biomol. NMR*, 18: 65-68.
- MAYER, M; MEYER, B. (1999). «Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy». *Angew. Chem. Int. Ed.*, 38: 1784-1788.
- MITTERMAIER, A. K. [et al.] (2009). «Observing biological dynamics at atomic resolution using NMR». *Trend. Biochem. Sciences*, 34 (12): 601-611
- PACHOLCZYK-SIENICKA, B. [et al.] (2014). «Prediction of survival for patients with advanced colorectal cancer using  $^1\text{H}$  high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy». *J. Mag. Reson. Imaging* (21 agost).
- PALMNAS, M. S. A.; VOGEL, H. J. (2013). «The future of NMR metabolomics in cancer

- therapy: towards personalizing treatment and developing targeted drugs». *Metabolites*, 3: 373-396.
- PÉREZ, Y. [et al.] (2013). «Lipid binding by the Unique and SH3 domains of c-Src suggests a new regulatory mechanism». *Sci. Rep.*, 3: 1295. DOI: 10.1038/srep01295.
- RELIGA, T. L. [et al.] (2010). «Dynamic regulation of Archaeal proteasome gate opening as studied by TROSY NMR». *Science*, 328: 98-102.
- SPRANGERS, R. [et al.] (2007). «Quantitative dynamics and binding studies of the 20S proteasome by NMR». *Nature*, 445: 618-622.
- SPRAUL, M. (2013). «Improved NMR wine screening heralds new era of wine quality control» [en línia] <http://www.theresonance.com/2013/categories/food-quality-safety/nmr-wine-qc>.
- WÜTHRICH, K. (1986). *NMR of proteins and nucleic acids*. Nova York: John Wiley & Sons.